

Identificação de um peptídeo cíclico, isolado das sementes de mamona  
(*Ricinus communis* L.) com atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi* e  
*Toxoplasma gondii*)

FRANCIANNE GALOSI DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –  
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

AGOSTO – 2022

Identificação de um peptídeo cíclico, isolado das sementes de mamona  
(*Ricinus communis* L.) com atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi* e  
*Toxoplasma gondii*)

FRANCIANNE GALOSI DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para obtenção do título de Doutor em  
Biociências e Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –  
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

AGOSTO - 2022

Identificação de um peptídeo cíclico, isolado das sementes de mamona  
(*Ricinus communis* L.) com atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi* e  
*Toxoplasma gondii*)

FRANCIANNE GALOSI DE SOUZA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para obtenção do título de Doutor em  
Biociências e Biotecnologia.

Aprovado em 31 de agosto de 2022.

Comissão examinadora:

---

Dr. Fábio César Sousa Nogueira – UFRJ

---

Dr<sup>a</sup>. Érica Oliveira Mello – UENF

---

Dr. Sérgio Henrique Seabra - UENF

---

Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares Machado – UENF (Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Francismar e Adriana, meu irmão Alexandre, minha avó Sebastiana, meu companheiro João Paulo e minha filha Helena por seu amor, compreensão, dedicação e por estarem sempre ao meu lado, dando-me forças para continuar.

À Dr<sup>a</sup> Olga Lima Tavares Machado por todos os ensinamentos durante estes anos, que foram passados com solidez científica, mas com todo o carinho, amizade e tranquilidade. Obrigada por tudo! Você é um exemplo de dedicação e força.

Aos membros da banca, professores Érica Oliveira Mello, Sérgio Henrique Seabra e Fábio César Sousa Nogueira pela atenção e profissionalismo ao aceitarem participar da banca examinadora.

Aos meus colaboradores e colegas, professor Edésio José Tenório de Melo, Laís Pessanha de Carvalho e Felipe Figueirôa Moreira, por todo o auxílio e parceria durante a realização dos experimentos.

As amigas do laboratório Caroline, Débora, Luciana, Mariana, Raquel, Tatiana, Isabela e Jucélia e a outros tantos amigos da UENF, pelo companheirismo, pelas conversas e pela alegria de poder tê-los por perto.

A todos os funcionários do LQFPP e do LBCT pela disponibilidade.

As instituições de fomento (UENF, Capes e Faperj) as quais financiaram todo o projeto e as minhas bolsas, sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

Meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE ABREVIÇÕES .....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
1.3. Resistência e estudos alternativos com plantas.....	20
1.4. <i>Ricinus communis L.</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.5. Peptídeos antimicrobianos (PAM's) e Ciclotídeos.....	23
2. Objetivo Geral.....	25
2.1. Objetivos Específicos:.....	25
3. Material e Métodos .....	26
3.1. Obtenção das sementes .....	26
3.2. Extração de peptídeos da semente de <i>Ricinus communis L.</i> .....	26
3.3. Cromatografia de exclusão molecular .....	26
3.4. Cromatografia de fase reversa utilizando sistema de alta eficiência (HPLC) ...	27
3.5. Dosagem de proteínas .....	28
3.6. Caracterização da amostra.....	28
3.7. Obtenção das células e parasitos.....	28
3.7.1. Manutenção das células hospedeiras (LLC-MK2) .....	28
3.7.2. Manutenção de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
3.7.3. Manutenção de <i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigota).....	29
3.7.4. Manutenção <i>Trypanosoma cruzi</i> intracelular (aquisição de tripomastigota) .	29
3.8. Ensaio antiparasitários .....	30
3.9. Avaliação morfológica e quantificação por microscopia óptica .....	30
3.10. Avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão.....	31
3.11. Caracterização de componentes da FBMM - Determinação da estrutura primária por sequenciamento N-terminal.....	31
3.12. Caracterização de componentes da FBMM - Espectrometria de massas .....	32
3.13. Produção do peptídeo sintético .....	32
3.14. Ensaio antitripanossomal in vitro .....	33
4. Resultados .....	34
4.1. Cromatografia de filtração em gel.....	34

4.2. Gel de eletroforese.....	35
4.3. Efeitos da FBMM nas células hospedeiras (LLC-MK2) não infectadas.....	36
4.4. Análise dos efeitos da FBMM sobre as formas extracelulares tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	39
4.5. Efeitos da FBMM sobre as células LLC-MK2 infectadas com <i>T. gondii</i> .....	42
4.6. Isolamento dos componentes presentes na FBMM.....	45
4.7. Sequenciamento N-terminal.....	45
4.8. Análise de espectrometria de massas.....	46
4.9. Componente não proteico presente na FBMM.....	50
4.10. Ensaio de toxicidade com o peptídeo isolado e com a ricinina.....	51
5. Discussão.....	54
6. Referências.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Barbeiro: inseto vetor da doença de Chagas.

Figura 2- Formas de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 3- Esquema do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4- Formas de vida *Toxoplasma gondii*.

Figura 5- Esquema do ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*.

Figura 6- Sementes de *Ricinus communis* L. (mamona).

Figura 7- Perfil cromatográfico da filtração em gel da FBMM.

Figura 8 - SDS-Tricina-PAGE da FBMM.

Figura 9 (a) - Efeitos citotóxicos do FBMM sobre as células LLC-MK2.

Figura 9 (b) - Análise por microscopia óptica dos efeitos da FBMM sobre as células LLC-MK2.

Figura 9 (c) - Análise ultraestrutural dos efeitos da FBMM sobre as células LLC-MK2.

Figura 10 (a)- Análise dos efeitos da FBMM sobre tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 10 (b)- Análise por microscopia óptica dos efeitos da FBMM sobre tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 10 (c)- Análise ultraestrutural dos efeitos da FBMM sobre tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 11 (a)- Análise dos efeitos da FBMM sobre taquizoítos de *Toxoplasma gondii* infectando as células hospedeiras LLC-MK2.

Figura 11 (b)- Análise por microscopia óptica dos efeitos da FBMM sobre taquizoítos de *Toxoplasma gondii* infectando as células hospedeiras LLC-MK2.

Figura 11 (c)- Análise ultraestrutural dos efeitos da FBMM sobre taquizoítos de *Toxoplasma gondii* infectando as células hospedeiras LLC-MK2.

Figura 12- Perfil de isolamento cromatográfico dos compostos presentes na FBMM por HPLC.

Figura 13 (a)- Perfil cromatográfico da ionização dos compostos da FBMM por Maldi-TOF- EM.

Figura 13 (b)- Sequência do RC-B4 obtida por espectrometria de massas.

Figura 14 (a)- Perfil de isolamento cromatográfico da ricinina e dos peptídeos da FBMM por filtração em gel.

Figura 14 (b)- Perfil cromatográfico de isolamento da ricinina e dos peptídeos da FBMM por HPLC.

Figura 15 – Análise do efeito dos peptídeos (purificado e sintético) e da ricinina em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 16 (a) – Determinação do IC50 do peptídeo sintético.

Figura 16 (b) – Determinação do IC50 do peptídeo purificado.



## LISTA DE ABREVIATÓES

**CB-1A** - alérgenos de mamona

**PAM's** - peptídeos antimicrobianos

**FBMM** - fração de baixa massa molecular

**TFA** - ácido trifluoroacético

**ACN** - acetonitrila

**BCA** - ácido bicinconínico

**BSA** - albumina sérica bovina

**SDS** - dodecil sulfato de sódio

**LLC-MK2** - epitélio renal de Macaca Mulata, macaco Rhesus

**RPMI** - meio de Eagle modificado de Dulbecco

**FBS** - soro fetal bovino

**PBS** - tampão fosfato salino

**LIT** - meio de cultura de triptose de infusão hepática

**NaCl** - cloreto de sódio

**DTT** - dithiothreitol

**IAA** - iodoacetamida

**OsO<sub>4</sub>** - tetróxido de ósmio

**HPLC** - cromatografia líquida de alta pressão

## Resumo

As plantas têm sido estudadas para uso no combate aos causadores de diversas doenças, pois ao longo de milhões de anos foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas, por serem submetidas a diversos fatores de estresse em seu ambiente. Elas expressam uma variedade de proteínas tóxicas, que conferem resistência contra herbívoros e patógenos, e que vão atuar em alvos moleculares específicos desses predadores. Embora já existam medicamentos para o combate do *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, quando invadem o hospedeiro e causam doenças, nos deparamos com fator da resistência desses parasitos a essas classes de fármacos, até agora descobertas e usadas para combatê-los. Isso implica na necessidade de identificar novos compostos com ação antiparasitária. Este projeto foi estruturado na extração de peptídeos de sementes de *Ricinus communis* L., visando seu potencial antimicrobiano. O perfil do extrato orgânico foi analisado por cromatografia de fase reversa (coluna C18) em sistema HPLC. Para os ensaios de efeito da FBMM, foram utilizadas células LLCMK2, parasitadas e não parasitadas por *T. gondii*. As ações dos componentes dessa fração foram investigadas diretamente sobre o parasito *T. cruzi* em meio extracelular. A identificação dos compostos com atividade tripanocida foi feita por eletroforese e o sequenciamento de proteínas por espectrometria de massa. O peptídeo isolado da FBMM apresentou inibição do crescimento de parasitos em até 50% nas concentrações de 10 e 15 µg/mL, fora e dentro das células respectivamente. Estudos empregando o peptídeo obtido por síntese em fase sólida, confirmam os resultados da eficiência do peptídeo purificado e ambos tiveram o resultado de eficiência sobre o parasito muito semelhantes. O peptídeo isolado apresentou massa molecular de Dalton <3,5 por SDS-tricina PAGE, N-terminal bloqueado e quando nativo, resistência às enzimas tripsina, endo-Glu e endo-Asp. Após desnaturação, redução e alquilação, o peptídeo pôde ser clivado pelas enzimas citadas e os peptídeos isolados foram parcialmente caracterizados por espectrometria de massa. Pela composição destes dados sequenciais, um peptídeo cíclico com sequência ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA foi caracterizado e o denominamos de RC-B4. Este peptídeo apresentou 90% de homologia com o peptídeo RC-B1, um peptídeo previamente identificado por espectros de MALDI e LC-MS durante a análise proteômica de extratos de diferentes cultivares de *R. communis*. Nossos dados permitem prospectar o uso deste peptídeo para o combate dos parasitos *T. cruzi* e *T. gondii*.

Palavras Chaves: Propriedades tóxicas de plantas, peptídeos antimicrobianos e parasitos.

## Abstract

Plants have been studied for use in combating the causes of various diseases, as over millions of years they have developed their own chemical defenses, as they are subjected to various stress factors in their environment. They express a variety of toxic proteins, which confer resistance against herbivores and pathogens, and which will act on specific molecular targets of these predators. Although there are already drugs to combat *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*, when they invade the host and cause disease, we are faced with a factor of resistance of these parasites to these classes of drugs, until now discovered and used to combat them. This implies the need to identify new compounds with antiparasitic action. This project was structured in the extraction of peptides from *Ricinus communis* L. seeds, aiming at their antimicrobial potential. The organic extract profile was analyzed by reversed-phase chromatography (C18 column) in an HPLC system. For the FBMM effect assays, LLCMK2 cells, parasitized and not parasitized by *T. gondii*, were used. The actions of the components of this fraction were investigated directly on the *T. cruzi* parasite in an extracellular medium. The identification of compounds with trypanocidal activity was performed by electrophoresis and protein sequencing by mass spectrometry. The peptide isolated from FBMM showed inhibition of parasite growth by up to 50% at concentrations of 10 and 15  $\mu\text{g/mL}$ , outside and inside the cells, respectively. Studies using the peptide obtained by solid phase synthesis, confirm the results of the efficiency of the purified peptide and both had very similar efficiency results on the parasite. The isolated peptide showed Dalton molecular mass <3.5 by SDS-tricine PAGE, N-terminal blocked and when native, resistance to trypsin, endo-Glu and endo-Asp enzymes. After denaturation, reduction and alkylation, the peptide could be cleaved by the aforementioned enzymes and the isolated peptides were partially characterized by mass spectrometry. By the composition of these sequential data, a cyclic peptide with sequence ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA was characterized and we named it RC-B4. This peptide showed 90% homology with the RC-B1 peptide, a peptide previously identified by MALDI and LC-MS spectra during proteomic analysis of extracts from different cultivars of *R. communis*. Our data allow us to prospect the use of this peptide to combat the parasites *T. cruzi* and *T. gondii*.

Key Words: Toxic properties of plants, antimicrobial peptides and parasites.

## 1. Introdução

Doenças causadas por parasitos representam um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil. Embora, nos dias atuais, haja o desenvolvimento da área farmacológica, nas medidas de saneamento básico e educação sanitária, as parasitoses são umas das mais frequentes doenças que acometem a população em todo o território nacional (Brum, J. W. A. et al., 2013; Amorim e Costa, 2021).

Existe uma escassez de dados precisos sobre a prevalência e a incidência das doenças parasitárias, o que dificulta a execução e o acompanhamento dos programas de saúde destinados a combater essas infecções (Brooker S. et al., 2006; Frei F. et al., 2008; Rosenthal et al., 2020).

### 1.1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2020). Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo e mais de 28 milhões estão em risco da doença (WHO, 2016).

O *T. cruzi* é transmitido vetorialmente ao hospedeiro vertebrado, através das fezes de triatomíneos (barbeiro) (figura 1), onde as formas infectantes são inoculadas após a picada do inseto (Coura, 2010). Também, pode ser transmitido por via oral, e os principais alimentos e bebidas associadas a essa infecção são caldo de cana-de-açúcar, açaí, suco de açaí, carne, água contaminada, suco de palma e suco de goiaba (Santana et al., 2019; Ferreira et al., 2018; Valente et al., 2009; Nóbrega et al., 2009; Barros et al., 2009).



Figura 1 – Barbeiro: inseto vetor da doença de Chagas (Disponível em: <http://www.insecta.ufv.br/Entomologia/ent/disciplina/ban%20160/Importancia%20medica/INSETOS%20E%20E7CAROS%20DE%20IMPO~de.htm> acesso em: 27/07/2016).

No hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* circula pelo sangue como tripomastigota e invade diferentes células, dentro das quais pode se reproduzir na forma de amastigota, principalmente nos tecidos cardíaco e digestivo (Chagas, 1916a-b; Chagas & Villela, 1922). Na figura 2 podem ser observadas as formas desse agente etiológico.

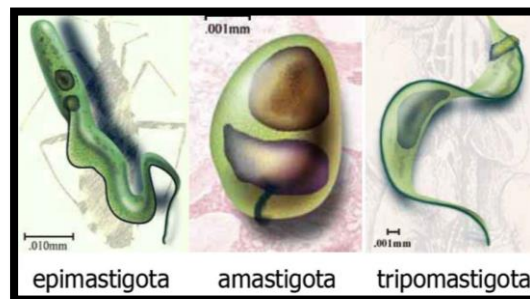


Figura 2- Formas do *Trypanosoma cruzi* encontradas no barbeiro (epimastigota) e nos hospedeiros vertebrados (amastigota e tripomastigota) (Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/363448/> acesso em 27/07/2016).

O ciclo biológico do *T. cruzi* (figura 3) acontece através da ida do homem para o ambiente silvestre, principalmente sob condições precárias que favorecem a domiciliação dos triatomíneos. Durante este ciclo, os reservatórios são o homem e pequenos mamíferos domésticos (gatos, cães, ratos e coelhos) que constituem um elo para manutenção da transmissão vetorial (Gürtler et al., 2007). A infecção de hospedeiros mamíferos pode ocorrer durante o repasto sanguíneo, quando um triatomíneo ingurgitado com *T. cruzi* elimina formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com fezes e urina. O parasito não é capaz de penetrar na pele íntegra, assim, formas tripomastigotas metacíclicas penetram através do ferimento causado pela picada do inseto vetor e/ou por pequenas fissuras presentes na pele do hospedeiro vertebrado. De 7 a 10 dias após o período de incubação o sítio de entrada do parasito no homem é marcado por uma lesão de pele denominada de chagoma de inoculação, geralmente na face do indivíduo (Romaña 1935). No hospedeiro

vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de invadir e desenvolver seu ciclo intracelular em diferentes tipos celulares (Brener, 1973). No interior de células de mamíferos, as formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas que se rediferenciam em tripomastigotas sendo liberadas após intensa multiplicação por ruptura da célula hospedeira. Assim, os parasitos liberados podem alcançar a corrente sanguínea e infectar outros tipos celulares ou serem ingeridos pelo inseto vetor. Uma vez no interior das células, os tripomastigotas são observados em vacúolos parasitóforos que se fundem com endosomas tardios e lisosomas (Meirelles et al., 1986; Woolsey & Burleigh, 2004). Os tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo após acidificação e formação de poros (Andrews et al., 1990). Quando livres no citoplasma, se diferenciam em formas amastigotas que iniciam o processo de divisão celular por fissão binária. Depois de sucessivas divisões, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que serão liberadas no interstício, após a ruptura da célula hospedeira (Brener, 1973; Chagas, 1909; 1911a, b; 1922).

As etapas do ciclo biológico no trato digestivo dos triatomíneos infectados começam com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas. Neste momento, os tripomastigotas alcançam o estômago do inseto onde se diferenciam em formas epimastigotas, forma multiplicativa no hospedeiro invertebrado (Garcia et al., 2010). Ao alcançar a parte posterior do intestino médio do triatomíneo, os epimastigotas sofrem sucessivas multiplicações e podem aderir a membrana perimicrovilar das células epiteliais (Gonzalez et al., 1999; Garcia et al., 2010). Logo após, os epimastigotas aderem à cutícula do reto, por interações hidrofóbicas e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo do inseto vetor (Garcia & Azambuja, 1991; Kollien & Schaub, 2000; Garcia et al., 2010), dando prosseguimento ao ciclo biológico.

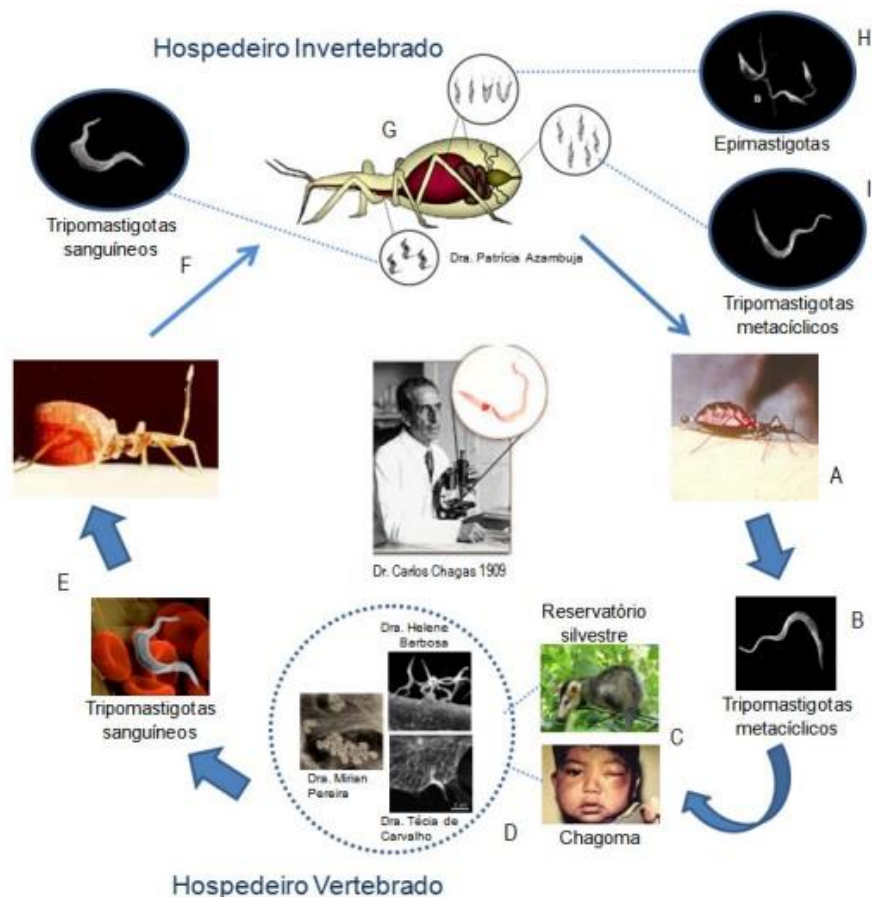


Figura 3 – Esquema do ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. (A) [http://www.fundep.ufmg.br/homepage/fotos\\_cases/barbeiro\\_interna.jpg](http://www.fundep.ufmg.br/homepage/fotos_cases/barbeiro_interna.jpg) (acessado em nov/2008). (B) [http://www.cib.uaem.mx/agebiol/pr03\\_archivos/image016.jpg](http://www.cib.uaem.mx/agebiol/pr03_archivos/image016.jpg) (acessado em nov/2008). (C) Dra. Mirian Pereira / Dra. Helene Barbosa / Dra. Têcia de Carvalho. (D) [http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/fevereiro/img/chagas\\_2.jpg](http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/fevereiro/img/chagas_2.jpg) (acessado em out/2008). (E) [www.fiocruz.br/ccs/media/chagas.jpg](http://www.fiocruz.br/ccs/media/chagas.jpg) (acessado em nov/2008). (F-H) <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=1> (acessado em nov/2008). (\*) Dra. Patrícia Azambuja. Adaptado por: Dr. Francisco Odencio Rodrigues de Oliveira Junior (2012).

Nifurtimox e benznidazol são os fármacos usados no tratamento da doença, utilizados principalmente no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, possuindo baixa eficácia na fase crônica da infecção (Jackson et al., 2010; APT, 2010). Estes possuem efeitos colaterais importantes como reações na pele; náusea; formigamento ou sintomas de inflamações nos nervos; dor de cabeça; vertigem;

fadiga; alterações no sangue, sendo algumas vezes necessária sua suspensão. Além disso, não podem ser usados no primeiro trimestre de gravidez, por mulheres em fase de lactação, pessoas com afecção neurológica, insuficiência hepática e insuficiência renal.

## 1.2. *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídio intracelular obrigatório, parasito de humanos e outros animais, pertencente à família Sarcocystidae (figura 4). Ele é causador da doença infecciosa chamada toxoplasmose, que é uma zoonose altamente disseminada, com taxas de prevalência variáveis entre 30 a 50%, na população humana, nas diversas partes do mundo (Amendoeira & Camillo-Couro, 2010; Flegr et al., 2014).



Figura 4- Formas do parasito durante a evolução (Disponível em: <http://resumao-e02.blogspot.com.br/2011/08/toxoplasmose.html> acesso em 29/06/2016).

O ciclo biológico do *T. gondii* é dividido em duas fases, a sexuada e a assexuada, ocorrendo no hospedeiro definitivo e no hospedeiro intermediário, respectivamente (figura 5). A forma infectante do parasito durante o ciclo é a taquizoítos (fase aguda da infecção); bradizoítos encontrados em vários tecidos (fase crônica da doença); e esporozoítos que são a forma de resistência. A fase sexuada começa quando um felídeo ingere oocistos esporulados de ambientes infectados ou cistos teciduais contendo trofozoítos, que se desenvolverão no epitélio intestinal do mesmo. Os esporozoítos ou trofozoítos darão origem a esquizontes e merozoítos, estes últimos formam o macro e o microgameta, respectivamente, que se unem e formam o zigoto e após formam o oocisto imaturo ou não esporulado. Estes rompem



a célula parasitada e são eliminados com as fezes do felídeo. A eliminação dos oocistos tem início de 3 a 20 dias após a infecção, e permanece em média por 7 a 15 dias, podendo sobreviver até um ano no ambiente. No meio externo, o oocisto amadurece ou esporula com cerca de 4 dias, formando 2 esporocistos e cada um contendo 4 esporozoítos (Mitsuka-Breganó et al., 2010). Já a fase assexuada ocorre num hospedeiro intermediário (homem, cão e aves). Este hospedeiro ingerindo ou entrando em contato com cistos contendo trofozoítos ou oocistos, ficará infectado. Após ingestão, a parede externa dos cistos ou oocistos é rompida por degradação enzimática e as formas infectantes, trofozoítos ou esporozoítos, são liberadas no lúmen intestinal onde rapidamente adentram as células do hospedeiro e se diferenciam em taquizoítos (formas de multiplicação rápida), por divisão assexuada até o rompimento da mesma. Os taquizoítos penetram em qualquer célula nucleada, formando um vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo sofrem rápidas e sucessivas divisões, formando novos taquizoítos, que rompem a célula parasitada e invadem novas células (fase proliferativa). Alguns taquizoítos, no entanto, invadem as células e desenvolvem uma cápsula cística a partir da parede do vacúolo parasitóforo, diminuindo seu metabolismo e transformando-se em bradizoítos. Isso acontece por resposta à imunidade do animal, o que caracteriza a fase crônica e permanecem em latência até que a doença volte a se tornar aguda (Mitsuka-Breganó et al., 2010).

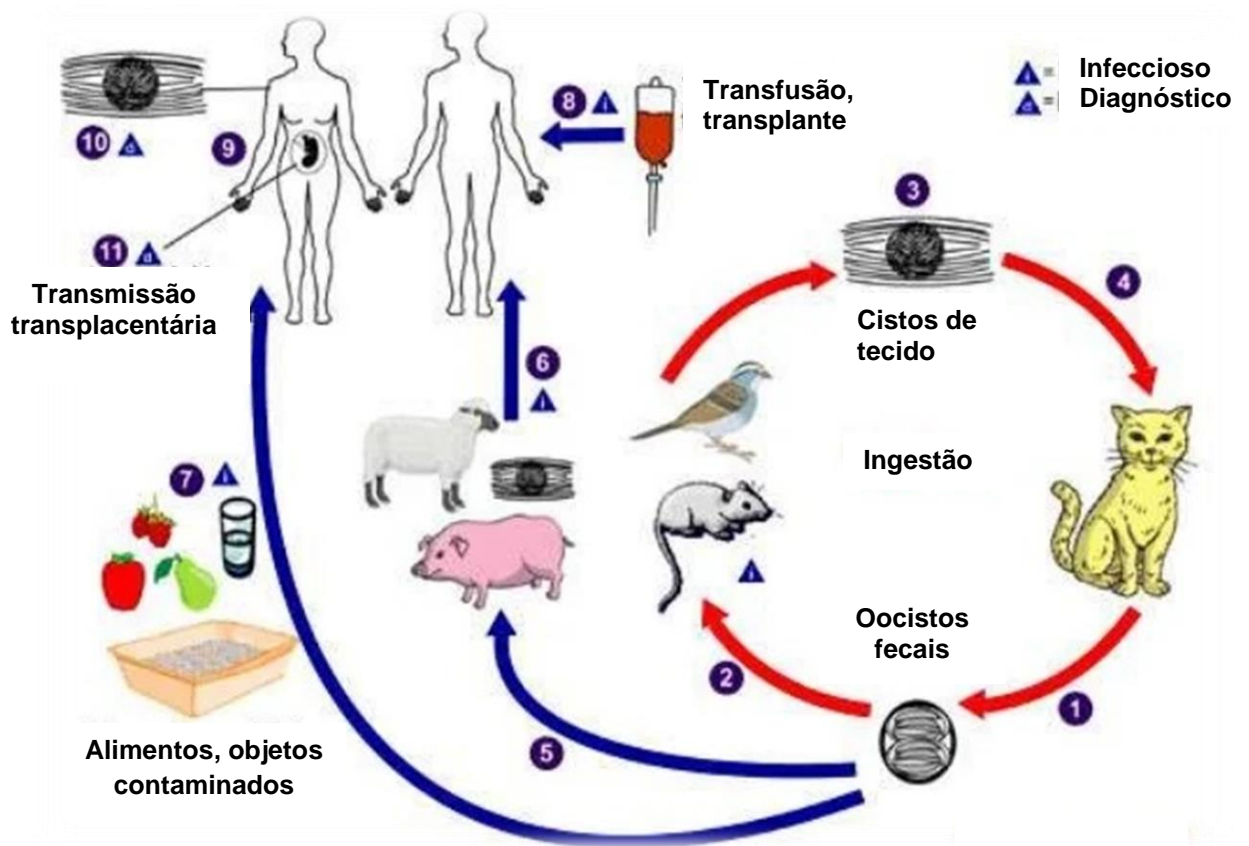


Figura 5 – Esquema do ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. (Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html> acesso em: 03/11/2022)

O homem pode adquirir a infecção por três vias: i) ingestão de oocistos provenientes do solo, areia, latas de lixo contaminadas com fezes de gatos infectados e ingestão de carne crua e mal cozida infectada com cistos, especialmente carne de porco e carneiro; ii) transmissão dos taquizoítos, forma encontrada durante a fase aguda da infecção, podendo ocorrer por transfusões sanguíneas, contato com secreções e excreções; iii) ou ainda por via transplacentária em gestantes primoinfectadas (Vaz, 2006; Walcher, 2017).

A toxoplasmose apresenta um quadro clínico variado, desde infecção assintomática a manifestações sistêmicas extremamente graves, manifestando-se de forma fulminante e com frequência letal, levando a encefalite, retinite, miocardite e a toxoplasmose disseminada (Remington, 1990).

Os que mais são acometidos por essa doença são:

Pacientes imunodeprimidos - uma imunossupressão significativa pode ser seguida por manifestação de sintomas graves. As lesões são fatais e vistas com maior

frequência no cérebro e, menos frequentemente, na retina, miocárdio, pulmões, medula óssea e até de maneira disseminada. As condições mais comumente associadas a essa forma são em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), transplantados ou com neoplasias (Trovão et al., 2013, Lee and Lee, 2017).

Fetos - a infecção da mãe é usualmente assintomática, não sendo geralmente detectada. Por isso, tem-se sugerido a realização de testes sorológicos na gestação, durante o acompanhamento pré-natal. Quando diagnosticada, deve ser instituída a quimioterapia adequada (Dias et al., 2011). As lesões sofridas dependem de quando a infecção aguda foi manifestada; se no primeiro trimestre de gravidez 25% dos fetos apresentam-se infectados, no segundo, 54% e no terceiro, 65%. A incidência de toxoplasmose aguda na gravidez pode gerar infecções fetais que resultam em morte intrauterina, e/ou dos que nascem, a maioria desenvolve lesões oculares, retardamento cerebral, a ventriculomegalia cerebral, microcefalia, calcificações intracranianas, hepatoesplenomegalia, ascite e placentomegalia (Koppe, et al., 1986; Caiaffa et al., 1993).

Já existem medicamentos utilizados no tratamento da toxoplasmose que são os antibióticos (espiramicina, pirimetamina, sulfadiazina), que além de seus efeitos colaterais podem induzir resistência (Thiébaut, et al. 2007; Montoya, et al. 2008). A sulfonamida acarreta risco de icterícia que pode levar a lesão cerebral e morte devido ao acúmulo de bilirrubina no cérebro do neonato; assim não deve ser usada no terceiro trimestre da gravidez. A sulfadiazina e pirimetamina produzem bloqueio em sequência do metabolismo do ácido fólico, e em altas doses, pirimetamina causa depleção do ácido fólico e supressão medular que pode se manifestar como anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia e pancitopenia (Carvalho & Farhat, 1999).

### **1.3. Resistência e estudos alternativos com plantas**

Embora já existam medicamentos para o combate *T. gondii* e *T. cruzi* quando invadem o hospedeiro e causam a doença, deparamo-nos com fator da resistência desses parasitos a essas classes de fármacos, até agora descobertas e usadas para

combatê-los (Filardi & Brener, 1987; Austin, et al., 1999; Campos et al., 2014). Isto implica na necessidade de identificar novos compostos com ação antiparasitária.

As plantas têm sido estudadas para uso no combate aos causadores de diversas doenças por possuírem uma grande quantidade de substâncias em sua composição, o que as tornam capazes de atingir uma gama maior de agentes patogênicos (Grayer & Kokubun, 2001).

#### **1.4. *Ricinus communis* L.**

As plantas competem por espaço e se defendem do ataque de herbívoros e patógenos, para sobreviver e evoluir. Ao longo dos milhões de anos, elas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas (Grayer & Kokubun, 2001). Por essa e outras razões, a constituição química das plantas é tão complexa, e é o porquê de muitas plantas sintetizarem substâncias para atuar em alvos moleculares específicos de seus predadores. Estas substâncias podem ser extraídas da casca, do caule, das folhas e dos frutos de diversas plantas (Pichersky & Gershenzon, 2002).

O sistema imune inato da planta constitui o primeiro mecanismo para a luta contra os agentes patogênicos que a invadem (Ferreira & Pinto et al., 2010). Compostos como metabólitos secundários, peptídeos antimicrobianos (PAM's), entre outros desempenham um papel-chave na defesa contra microrganismos, utilizando diversos modos de ação (Broekaert et al., 1995; Garcia-Olmedo et al., 1995; Ng, 2004).

Alguns estudos já foram realizados utilizando plantas variadas com o objetivo de analisar os efeitos parasiticidas de proteínas e peptídeos. Nascimento (2004) relatou que o peptídeo Rc-Knotin, extraído de sementes de *Ricinus communis* L. (mamona), inibe a atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar e da  $\alpha$ -amilase de insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*. Já Lelis (2012) mostrou os efeitos dos extratos obtidos de *Ottonia frutescens* e *Trigynaea oblongifolia* que inibiram a ovoposição de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*. Em 2015, Silva relatou o uso da torta de *Ricinus communis* L. como inibidor de protease (RcTI) agindo no controle tanto da germinação do fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* quanto no desenvolvimento larval de *A. aegypti*. Também, em Rondon 2011, testou frações de *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* e *Ricinus communis* L. em etil acetato, clorofórmio e metanol contra *Leishmania*. A fração de acetato de etilo de *R. communis* apresentou

os melhores resultados. Esta fração foi altamente eficaz contra promastigotas de *L. Infantum* e amastigotas.

Como descrito anteriormente, *Ricinus communis* L. tem sido uma espécie de planta explorada em estudos que utilizam suas propriedades contra agentes ou vetores causadores de doenças. No processamento das sementes (figura 6) da mamona é extraído o óleo, cujo teor varia entre 45% e 50% (Berman, 2011; Freitas, 2011). Neste processo, outro produto é gerado: a torta. Este co-produto é rico em proteínas com propriedades alergênicas e tóxicas em sua estrutura, o que torna esta planta resistente às pragas (Lima, 2011).

Nas sementes e no pólen, encontra-se um grupo de glicoproteínas denominado complexo CB-1A - Castor-bean allergen, uma mistura de proteínas de massa molecular de 10 e 18 kDa que apresenta propriedades alergênicas, sendo pertencentes à família das albuminas 2S, que é o principal grupo de proteínas de reserva presente nas dicotiledôneas (Youle & Huang, 1978). A ricinina, que é um alcalóide volátil, tem maior concentração no tegumento (257,6 mg/kg a 431,2 mg/kg) do que no endosperma (30,8 mg/kg a 77,1 mg/kg) da semente. Isto indica que a ricinina é importante na defesa química contra predadores de sementes, embora apresente baixa atividade tóxica e esteja pouco concentrado na torta. Sendo sintetizado em maior quantidade em situações como danos mecânicos ou alta temperatura (Carvalho, 1978; Moshkin 1986; Beltrão & Lima, 2007). A proteína ricina que é altamente tóxica, foi classificada como uma proteína inativadora de ribossomos (RIP) do tipo 2 (Thomas & LI Steven, 1980; Olsnes, 2004; Lorenzi et al., 2011). Além destes compostos, peptídeos protetores estão sendo citados e identificados (Nascimento, 2002; Ovenden et al., 2009; Boldbaatar et al., 2015).



Figura 6 - Sementes de *Ricinus communis* L. (mamona), cultivar IAC-226. (Disponível em: <https://acasatorta.wordpress.com/2008/08/06/ricina/> acesso em: 29/06/2016).

## 1.5. Peptídeos antimicrobianos (PAM's) e Ciclotídeos

Os peptídeos antimicrobianos apresentam uma variedade de funções como: função estrutural (Saadi et al., 2021), de reserva energética (Suyetin et al., 2021), transporte (Cross et al., 2021), enzimática (Rathnayake et al., 2021), hormonal (Albrechtsen & Rehfeld, 2021) e na defesa dos organismos contra organismos invasores (fungos, bactérias, parasitos ou vírus) como é o caso dos PAM's (Martell et al., 2021; Saiqali et al., 2021).

Peptídeos antimicrobianos (PAM's) têm sido amplamente estudados por sua ação como agentes alternativos aos antibióticos convencionais, em uma tentativa de abordar a ameaça de patógenos multirresistentes (Ashby et al., 2017). Estas moléculas são conhecidas por sua versatilidade (Capecchi et al., 2020). As variações nas sequências de aminoácidos levam a elevadas mudanças nas características estruturais e físico-químicas, que podem ser vistas em suas atividades biológicas. Os PAM's são conhecidos por atuarem por meio de múltiplos mecanismos de ação, dificultando a aquisição de resistência por microrganismos (Lázár et al., 2018).

Grande parte dos PAM's atua afetando a integridade da membrana dos microrganismos, causando desestabilização, seguida pela inserção do peptídeo na bicamada lipídica. Existem, também, alguns PAM's que tendem a se reunir e formar poros ou despolarizar a membrana. Eles têm sido relatados como ativos contra todos os tipos de microrganismos, incluindo patógenos protozoários; enquanto outros, atuam em alvos internos ou por modulação do sistema imunológico do hospedeiro (Sabiá Júnior et al., 2019).

Existe um grupo de peptídeos bacterianos (PAM's) que é considerado especial: os ciclotídeos. Estes compõem uma classe de peptídeos que possuem uma cadeia fechada e se difere das demais pela conformação circular diferente de outras estruturas de peptídeos que são lineares (Malagón et al., 2013; Neves, 2018). Estes peptídeos cíclicos são sintetizados a partir de reações de ciclização cabeça-cauda (ciclização da espinha dorsal), que elimina os grupos amina N-terminal e C-terminal que são altamente polares (Hill, T. A. et al., 2014).

Os ciclotídeos são proteínas cíclicas codificadas por genes e produzidas pelo ribossomo. Sua biossíntese é considerada um processo de várias etapas que

envolvem enzimas para tradução, isomerização de dissulfeto, transporte, clivagem e finalmente a ciclização. As proteínas precursoras de ciclotídeo contêm predomínios que irão direcionar organelas que contenham sequências necessárias para ciclização, além de um ou mais domínios que constituem o produto cíclico final (Shafe et al., 2015).

Sabe-se que eles são codificados por genes expressos como proteínas precursoras e processados pós-tradução para produzir uma estrutura cíclica, sendo considerados a maior família de proteínas circulares, com mais de 250 sequências relatadas (Craik & Malik, 2013)

O primeiro ciclotídeo descrito, no início da década de 1960, por um médico norueguês, foi o Kalata B1, isolado de planta *Oldenlandia affinis*, cujo nome popular é popular Kalata kalata (Gran, 1973). Uma tribo de codinome Lulula utilizava o extrato aquoso dessa planta com o intuito de facilitar o parto, pois esse chá possui características uterotônicas (Jennings, 2001).

Outro grupo de peptídeos cíclicos são os Knottins que fazem parte da superfamília de peptídeos ricos em cisteína (CRPs), compartilhando o motif Cisteína-knot ou nó de cisteína, portanto, assemelhando-se a outras famílias como defensinas, heveínas e ciclotídeos (Molesini, B. et al., 2017). Tendo sua estrutura identificada por cristalografia de carboxipeptídios isolados de batata, mostrando seu motif com 39 aa e 6 resíduos de cisteína, formando 3 pontes dissulfetos interligados (Rees, D. C. & Lipscomb, W. N., 1982).

Knottins possuem atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus e atividade inseticida (Aboye, T. L. et al., 2015; Göransson, U. et al., 2012; Gustafson, K. R. et al., 1994; Jennings, C. V. et al., 2005). Sua atividade antimicrobiana foi atribuída à ação de componentes funcionais do plasma membrana, levando a alterações de lipídios, fluxo de íons e exposição carga (Göransson, U. et al., 2012). O acúmulo desses peptídeos na superfície da membrana resulta no enfraquecimento da membrana do patógeno (Burman, R. et al., 2011), resultando em perfurações transitórias e toroidais (Göransson, U. et al., 2012).

Peptídeos cíclicos encontrados na natureza já tem sido usados na clínica, pois oferecem uma variedade de usos terapêuticos como antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório, anticancerígeno, antiviral, antidiabético e antimalárico (Huan, Y. et al., 2020; Chan-Zapata, I. et al., 2019; Xie, M. et al., 2020; Fernández de Ullivarri, M. et al., 2020; Yan, J. et al., 2019; Benitez, 2010; Oliveira, et al. 2009; Medeiros, 2011;

Chowdhury, S. M. et al., 2020; Wang, K et al. 2020; Sweeney-Jones, A. M. et al., 2020). Alguns exemplos destes peptídeos são, gramicidina e tirocidina que com atividade bactericida, ciclosporina A com atividade imunossupressora e a vancomicina com atividade antibacteriana (Loffet, A. 2002).

Os principais mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos naturais e sintéticos envolvem a interação com a membrana celular, perturbando a integridade da membrana e induzindo lise celular osmótica ou modificando a fluidez da membrana e prejudicando a atividade das proteínas ligadas a membrana.

Um outro mecanismo de ação dos PAM's está relacionado a sua translocação para dentro da célula e interação com alvos intracelulares, causando colapso das vias metabólicas e bioenergéticas.

A partir de todos os pontos apresentados anteriormente, houve o interesse do nosso grupo em investigar as frações de mamona (*Ricinus communis L.*). Segundo Souza-Galossi 2018, em um estudo preliminar, a fração proteica de baixa massa molecular (MM < 10 kDA) de sementes de *Ricinus communis L.*, inibiu o desenvolvimento dos parasitos *T. cruzi* e *T. gondii* em 50% no meio intracelular e extracelular. Neste trabalho, os componentes da fração de baixa Massa molecular, foram isolados e seus efeitos sobre *T. gondii* e *T. cruzi* foram testados. A elucidação da estrutura desses compostos e o seu mecanismo de ação, poderá contribuir ao combate desses parasitos.

## **2. Objetivo Geral**

Analisar o uso de peptídeos (presentes na fração de baixa massa molecular), extraídos e isolados das sementes de mamona (*Ricinus communis L.*), contra parasitos (*Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*).

### **2.1. Objetivos Específicos:**

- Extrair e purificar a fração de baixa massa molecular (>10kDa) de *Ricinus communis L.*;
- Isolar os peptídeos presentes na fração de baixa massa molecular;



- Testar o efeito dos peptídeos presentes na fração de baixa massa molecular sobre os parasitos;
- Avaliar por microscopia óptica as mudanças na quantidade de parasitos no meio de cultura e/ou interior das células hospedeiras, após tratamento com os peptídeos, com relação ao controle;
- Observar através microscopia eletrônica de transmissão as alterações morfológicas nos parasitos após tratamento com os peptídeos;
- Caracterizar os peptídeos antiprotozoários quanto a sua estrutura química.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Obtenção das sementes**

As sementes de *Ricinus communis* L. foram fornecidas pela “Empresa Brasileira de Pesquisa e Agricultura (Embrapa)” – Campinas, São Paulo.

#### **3.2. Extração de peptídeos da semente de *Ricinus communis* L.**

A fração de baixa massa molecular (FBMM >10kDa) da semente de mamona foi extraída de acordo com a metodologia descrita por Craik et. al. (2012), com algumas adaptações. As sementes de mamona (200 gramas) foram descascadas e maceradas. À massa resultante, foi adicionado metanol até cobrir toda a massa. O mesmo volume de diclorometano foi adicionado e deixado sob agitação por 12 horas em temperatura ambiente. O homogenato foi filtrado para remoção de detritos e adicionado um pouco de água para separar a parte proteica da fase oleosa presente na semente. Para otimizar essa separação de fases, fizemos uma centrifugação e concentramos a parte proteica recolhida, utilizando uma centrífuga a vácuo (Speed-Vac, Savant – Modelo SC1110). O volume final foi armazenado em geladeira a 4° C.

#### **3.3. Cromatografia de exclusão molecular**

O extrato proteico (1 mL) obtido foi submetido à cromatografia de filtração em gel utilizando resina Sephadex-G-50 equilibrada em TFA 0,1%. As amostras foram eluídas com TFA 0,1% utilizando um fluxo de 1,0 mL/min e frações de 1,0 mL foram coletadas e monitoradas a 220 nm.

A fração de baixa massa molecular (FBMM > 10kDa) foi submetida a uma nova cromatografia de filtração em gel, utilizando resina Sephadex-G-10 equilibrada em TFA 0,1%. As amostras foram eluídas com TFA 0,1% utilizando um fluxo de 1,0 mL/min, monitoradas a 220 nm.

#### **3.4. Cromatografia de fase reversa utilizando sistema de alta eficiência (HPLC)**

A fração de baixa massa molecular (FBMM >10kDa), de maior interesse neste projeto, foi submetida a um novo processo de purificação através de uma cromatografia líquida de fase reversa (coluna C18) com fase móvel A (H<sub>2</sub>O+ TFA 0,1%) e fase móvel B (H<sub>2</sub>O+ TFA 0,1% + ACN 80%). Os peptídeos isolados foram secos em centrífuga a vácuo (Speed-Vac, Savant – Modelo SC1110) e armazenados para análises futuras. Durante a eluição empregamos o gradiente descrito abaixo.

Tempo (min.)	Concentração de B (%)
0.01	0
10.00	0
25.00	15
50.00	100
52.00	100
55.00	0
60.00	Interrupção

### **3.5. Dosagem de proteínas**

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi feita pelo método de BCA - Ácido Bicinconínico (Smith et al., 1985), sendo utilizada a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu, a  $\lambda$ 595nm.

### **3.6. Caracterização da amostra**

A FBMM foi submetida à análise por Tricina-SDS-PAGE conforme descrito por Schägger & Von Jagow (1987). As amostras (30  $\mu$ g por raia) foram solubilizadas em tampão de amostra (200 mM Tris-HCl, pH 6,8; 16% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,04% coomassie Blue G, 48% glicerol e 8% de  $\beta$ -mercaptoetanol) e aplicadas em mini-slab gel Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Estes géis foram submetidos 32 V por cerca de 12 horas e a seguir 200V até o final da corrida. Os peptídeos foram corados durante 1 hora com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich). As bandas de peptídeos no gel foram visualizadas por descoloração usando uma solução contendo 10% de ácido acético. Marcadores de massa molecular, 1-24 kDa, BIO-Rad foram usados como padrões

### **3.7. Obtenção das células e parasitos**

As células LLC-MK2 e parasitos foram obtidos de culturas presentes no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) em colaboração com o Prof. Edésio José Tenório de Melo e com o Prof. Sérgio Henrique Seabra.

#### **3.7.1. Manutenção das células hospedeiras (LLC-MK2)**

As células LLC-MK2 (epitélio renal de Macaca Mulata, macaco Rhesus) foram mantidas em frascos de cultura estéril de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI 1640 (meio de Eagle modificado de Dulbecco, Sigma) suplementado com 5% de FBS (soro fetal bovino, Sigma) e estreptomicina (1  $\mu$ g / ml). As garrafas foram armazenadas a 37 ° C em 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi alterado a cada 48 horas. O ensaio de

viabilidade celular foi realizado em culturas subconfluentes usando placas de cultura de 96 poços (SPL Life Sciences).

### **3.7.2. Manutenção de *Toxoplasma gondii***

Antes da infecção, as células hospedeiras foram quantificadas quando se aproximaram da semi-confluência. Os parasitos libertados foram centrifugados a 324xg durante 10 min. Uma alíquota de 10 microlitros foi diluída em 90 microlitros de líquido de contagem (75% de líquido de contagem e PBS a 25%) e uma alíquota de 10 microlitros foi quantificada a partir da câmara de Neubauer. Após as quantificações, foi feita uma interação de 10 parasitos por célula. Após 48 h, os parasitos foram liberados no meio de cultura. Então todo o processo foi repetido para infecção de células novas.

### **3.7.3. Manutenção de *Trypanossoma cruzi* (epimastigota)**

Os epimastigotas de *T. cruzi* (cepa DM28) foram cultivados em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (SPL Life Sciences) em 5 mL do meio de cultura de triptose de infusão hepática (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino, (FBS - Gibco) e 4% de hemine a 28 ° C. As passagens de cultura foram realizadas a cada 4 ou 5 dias, passando 1 mL de parasitos, ainda em crescimento exponencial da população, em um novo tubo ao qual foi adicionado meio de cultura fresco atingindo 5 mL (Alexandrino et al., 2016).

### **3.7.4. Manutenção *Trypanossoma cruzi* intracelular (aquisição de tripomastigota)**

Os epimastigotas foram climatizados a 37 ° C em meio RPMI 1680 durante 3 dias e depois utilizados para infectar células hospedeiras LLC-MK2, em um processo semelhante ao descrito acima para *T. gondii*. Após sete dias, os tripomastigotas foram liberados no meio de cultura e coletados para ensaios de citotoxicidade.

### 3.8. Ensaios antiparasitários

Para realizar o ensaio, as culturas celulares não infectadas em monocamada foram lavadas três vezes com 3 mL de PBS (solução salina tamponada com uma concentração de fosfato de sódio de NaCl 200 mM e 150 mM, pH 7,1) e tratada com tripsina, sendo assim suspensa. Esta suspensão foi dividida em uma placa de 24 poços, a uma taxa de  $3,0 \times 10^4$  células por poço e armazenadas durante 24 h. Após este período, as células não infectadas foram incubadas com a FBMM. A outra parte destas células, foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* a uma taxa de 5:1 (parasitos: células hospedeiras) e cultivadas durante mais 24 h; após esse período também incubadas com a FBMM.

Os tripomastigotas de *T. cruzi* foram lavados três vezes com 3 mL de PBS (solução salina tamponada com uma concentração de fosfato de sódio de NaCl 200 mM e 150 mM, pH 7,1), divididos em uma placa de 96 poços, a uma taxa de  $1,6 \times 10^6$  parasitos por poço e incubadas com as proteínas.

Para incubação, a fração de baixa massa molecular (FBMM >10kDa), obtida por cromatografia de filtração em gel, foi diluída em meio de cultura e esterilizada em um filtro de poro de 0,22 nm. Em seguida, o filtrado foi incubado nas células não infectadas ou infectadas e nos parasitos extracelulares, em triplicata, nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 50 e 100 µg/mL durante 24 e 48 horas.

### 3.9. Avaliação morfológica e quantificação por microscopia óptica

Após os tratamentos, as células hospedeiras não infectadas e infectadas com *T. gondii* foram lavadas três vezes com PBS, fixadas durante 5 minutos na solução de Bouin e lavadas quatro vezes com PBS para realizar análises morfológicas e quantificação. Em seguida, as células foram coradas com solução de Giemsa (10%, v / v) à temperatura ambiente durante 6 horas. As lamínulas contendo as células foram desidratadas em uma mistura de acetona-xilol e colocadas em lâminas histológicas. Todas as preparações foram examinadas sob um microscópio óptico (Zeiss Axioinvert 135) equipado com um objetivo de 20 e 40 x. As imagens foram obtidas com um DP72 Olympus câmera com a análise de software (Cell ^ F) (Melo et al., 2011). O mesmo processo descrito acima foi utilizado para *T. cruzi* extracelular.

### **3.10. Avaliação ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão**

Para análise ultra-estrutural, células não infectadas ( $3,0 \times 10^4$ ) ou células hospedeiras infectadas com *T. gondii* (5:1 (parasitos: células hospedeiras)) e tripomastigotas ( $1,6 \times 10^6$ ) foram tratadas com fração de baixa Massa molecular (FBMM) a 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 horas. Em seguida, as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a 906xg, lavadas com PBS durante mais 10 minutos e re-centrifugadas a 906xg. A fixação foi realizada utilizando 4% de formaldeído, 1% de glutaraldeído, tampão de cacodilato de sódio 0,2 M, 1,5 mL de água destilada e 5% de sacarose durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 906xg e lavadas com uma solução 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio. O sedimento resultante foi pós-fixado com 2% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio durante 1,5 hora à temperatura ambiente e no escuro. As amostras pós-tratadas foram lavadas em tampão de cacodilato de sódio, centrifugadas duas vezes e desidratadas em uma série em crescimento de acetona (30%, 50%, 70% e 90%). Após a desidratação, as amostras foram incubadas numa solução de 100% de acetona (composto puro) durante 6 horas. Em seguida, os materiais foram polimerizados num forno a 60 ° C durante 48 horas. Secções ultrafinas foram obtidas utilizando ultramicrótomos Reichert Ultracuts Leica Instruments, que foram contrastados com acetato de uranil aquoso a 5% durante 20 minutos e citrato de chumbo no escuro por 5 minutos. Os materiais foram observados e fotografados com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1400 Plus com uma tensão de aceleração de 80 kV.

### **3.11. Caracterização de componentes da FBMM - Determinação da estrutura primária por sequenciamento N-terminal**

Estudos preliminares demonstraram a dificuldade de elucidação da estrutura primária do principal componente da fração de baixa massa molecular (FBMM > 10kDa) com ação anti-protozoária. Por isto, antes do sequenciamento, a proteína de interesse foi tratada com ureia 6M a 37°C por duas horas para desnaturação. A seguir, foi tratada com DTT 100 mM para redução das pontes de enxofre, a 37° C por

duas horas e foi incubada com iodoacetamida 100 mM para alquilação dos resíduos de cisteína (por 2h a 37° C). A amostra desnaturada, reduzida e alquilada foi submetida à clivagem enzimática pelas enzimas tripsina, Endo-glutamase e N-aspartase.

Os peptídeos foram submetidos diretamente ao sequenciamento N-terminal, metodologia de Edman, usando o sequenciador de PPSQ-33, Shimadzu ou por espectrometria de massas.

### 3.12. Caracterização de componentes da FBMM - Espectrometria de massas

Uma alíquota contendo 5 µg da amostra (pool de peptídeos) seca, em centrífuga a vácuo (Speed-Vac, Savant – Modelo SC1110), foi suspensa em 10 µL de água grau de pureza EM (Tédia). Logo após, a amostra foi, resumidamente, **Reduzida** (adição de 30 µL da solução de DTT a 10 mM incubando por 30 minutos no Thermomixer a 25 °C sob agitação de 5 em 5 minutos), **Alquilada** (adição de 30 µL da solução de IAA a 50 mM incubando por 30 minutos, no escuro, no Thermomixer a 25 °C sob agitação de 5 em 5 minutos) e **Digerida** (adição de 20µL de Tripsina deixando incubado no Thermomixer por 17 horas a 37 °C). O extrato foi concentrado até 20 µL usando um Speed Vac, dessalinizada por C18 Zip Tip ( Millipore, Billerico , MA , EUA), concentrado mais uma vez até 20 µL e transferido para frascos *Total Recovery* ( Waters).

Os peptídeos gerados foram separados em Nano Aqcquity UPLCa, uma coluna de fase reversa. A espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, UK); os espectros adquiridos foram processados em *Software ProteinLynx Global SERVER* (PLGS), utilizando como base de dados Uniprot/*Ricinus communis L.* Informações adicionais foram buscadas em *software Blast2Go*.

### 3.13. Produção do peptídeo sintético

O peptídeo sintético foi sintetizado pela BIOMATIK (EUA) através da sequência de aminoácidos que fornecemos. A avaliação da homogeneidade deste peptídeo foi

feita por cromatografia de fase reversa C18-HPLC (fase móvel A:TFA 0,1% e B: TFA 0,1% + 100% ACN).

### **3.14. Ensaio antitripanossomal in vitro**

Parasitas epimastigotas de *T. cruzi* ( $1 \times 10^6$ ) foram adicionados nos frascos de cultura contendo LIT suplementado com FBS. Foram adicionados 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos compostos ricinina, peptídeo purificado, peptídeo sintético e fração de baixa Massa molecular e os parasitos foram quantificados a cada 24 h até 96 h de tratamento. A quantificação dos parasitos foi realizada por contagem direta através de um microscópio de luz de fase em uma câmara de Neubauer em triplicata. Os parasitos foram tratados também em diferentes concentrações (1, 5, 10 15 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dos peptídeos purificado e sintético.

Os resultados são mostrados como a porcentagem de crescimento do parasito em diferentes concentrações dos compostos peptídicos em um período de tempo de tratamento distinto. A porcentagem de crescimento do parasito permite uma observação clara do efeito do tratamento entre o início e o final dos momentos de tratamento. Para calcular a porcentagem de crescimento do parasito o número de parasitos do controle não tratado foi ajustado para 100% e os valores dos parasitos tratados com concentrações distintas dos compostos foram derivados proporcionalmente. Por cálculos da concentração que inibe o crescimento do parasito em 50% (IC50), a porcentagem de crescimento do parasito foi plotada em função da concentração utilizada dos compostos e uma curva de regressão não linear foi calculada. As análises de regressão foram realizadas usando o software Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA). Eventualmente, nos tempos de tratamento mais longos o número IC50 foi extrapolado com base nas curvas de regressão calculadas com Sigma Plot 8.0 software (Systat Software Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados dos cálculos de IC50 são apresentados como média  $\pm$  SD de três réplicas biológicas independentes.

Para análise da ultraestrutura do parasito, parasitos não tratados e tratados (1,5,10, 15 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 h até 96 h) foram fixados por 1 h em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído recentemente preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.4. Após esses procedimentos, os



parasitos foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 10 min e pós-fixada por 1 h no escuro com uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) e 1,6% de ferrocianeto em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, os parasitos foram lavados no mesmo tampão, desidratados em acetona e incluídos em Epon. Seções ultrafinas foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados sob um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1400 Plus com uma tensão de aceleração de 80 kV.

## 4. Resultados

### 4.1. Cromatografia de filtração em gel

A figura 7 mostra o perfil cromatográfico em Sephadex G-50 relativo ao fracionamento do extrato bruto de proteínas da semente. Três frações proteicas foram obtidas: F1, tubos 21 a 44, Fração de massa molecular ( $\text{MM}$ ) > 35 kDa, enriquecida em ricina; FII, tubos 45 a 65, fração  $35 > \text{MM} > 10$  kDa, região onde se encontram as albuminas 2S; e FIII, tubos 66 a 85 fração de massa molecular <10 kDa, denominada fração de baixa Massa Molecular (FBMM).

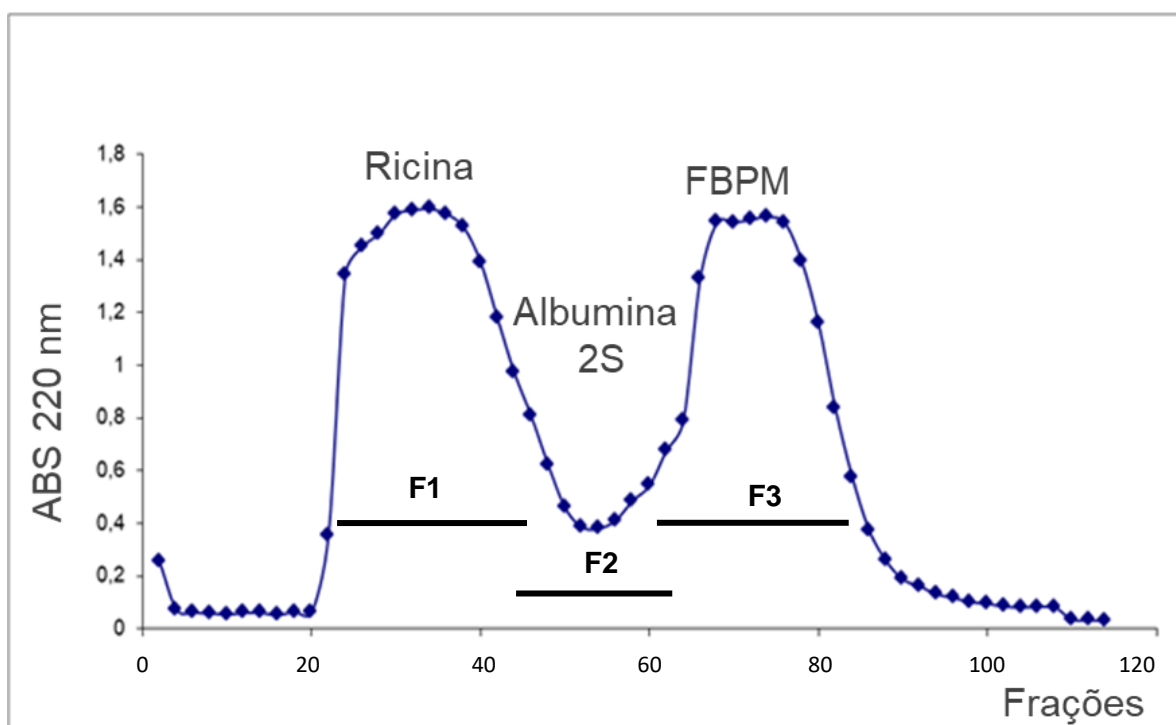


Figura 7- Perfil cromatográfico da filtração em gel empregando a resina Sephadex G-50, coluna 50x1,0 cm; Eluente TFA 0,1% com fluxo de 1,0 mL por minuto; foram coletados frações de 1,0 mL / tubo. FBMM - fração de baixa Massa molecular.

#### 4.2. Gel de eletroforese

A homogeneidade e a massa molecular dos componentes presentes na FBMM, avaliadas por Tricina-SDS-PAGE são apresentadas na figura 8. O gel foi corado com Coomasie Blue G, onde uma banda com massa entre 3.5 e 1.4 kDa foi observada, indicada com uma seta azul.

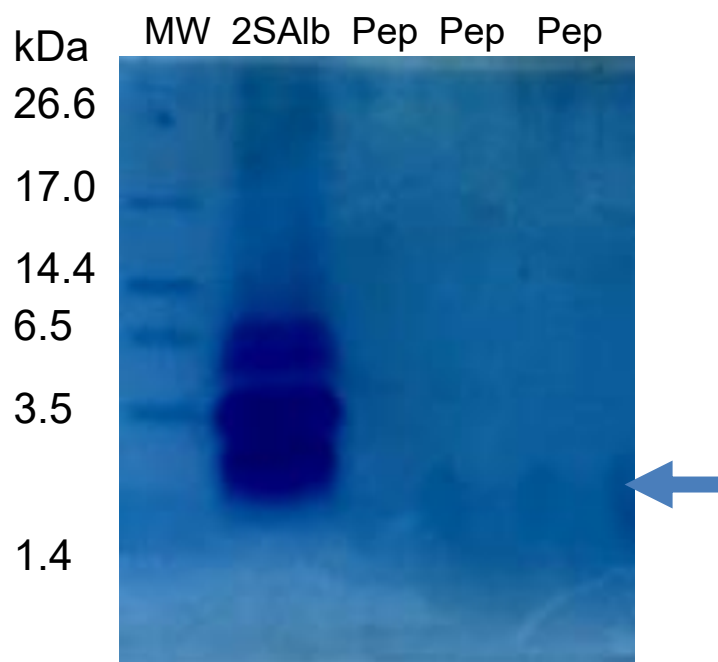


Figura 8 - SDS-Tricina-PAGE da FBMM. Coloração com Coomassie Brilliant Blue G. raias: 1, MW, marcador de Massa molecular; 2, Albumina 2S de *Ricinus communis* L.;

3, 4 e 5, Peptídeos da Fração de Baixa Massa molecular (seta), nas concentrações de 5, 10 e 15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente. Todas as amostras foram tratadas com  $\beta$  mercaptoetanol.

#### **4.3. Efeitos da FBMM nas células hospedeiras (LLC-MK2) não infectadas**

Os efeitos da FBMM em células LLC-MK2 foram investigados (figura 9a), como controle de toxicidade celular, antes das análises desta fração em presença de protozoários.

As culturas de células apresentaram morfologia típica, bem espalhadas com citoplasmas não vacuolados. (figura 9b, A). A FBMM não provocou alterações celulares, após 24 h de incubação quando concentrações de 10 e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram empregadas (figura 9b, B e C). As células, entretanto, passaram a apresentar núcleos condensados e citoplasmas retraídos a 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (figura 9b, D), que se tornaram mais aparentes a 40 e 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , sob  $3 \times 10^4$  células por poço (figura 9b, E e F). A FBMM mostrou-se tóxica, eliminando 65% das células, quando foram aplicadas concentrações maiores ou igual a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 horas e 100% de destruição das células quando estas foram incubadas com FBMM por 48 horas.

As células examinadas por microscopia eletrônica confirmaram que o tratamento com 15  $\mu\text{g}$  de FBMM / mL, por 24 h, era realmente seguro para as células hospedeiras. Ambas as células, não tratadas (figura 9c, A) e tratadas (9c, B) a 15  $\mu\text{g} / \text{mL}$  apresentaram morfologias típicas e arranjos organelares mantidos, indicando que essas condições não eram tóxicas, podendo ser empregadas para teste de ação anti-protozoários intracelulares.

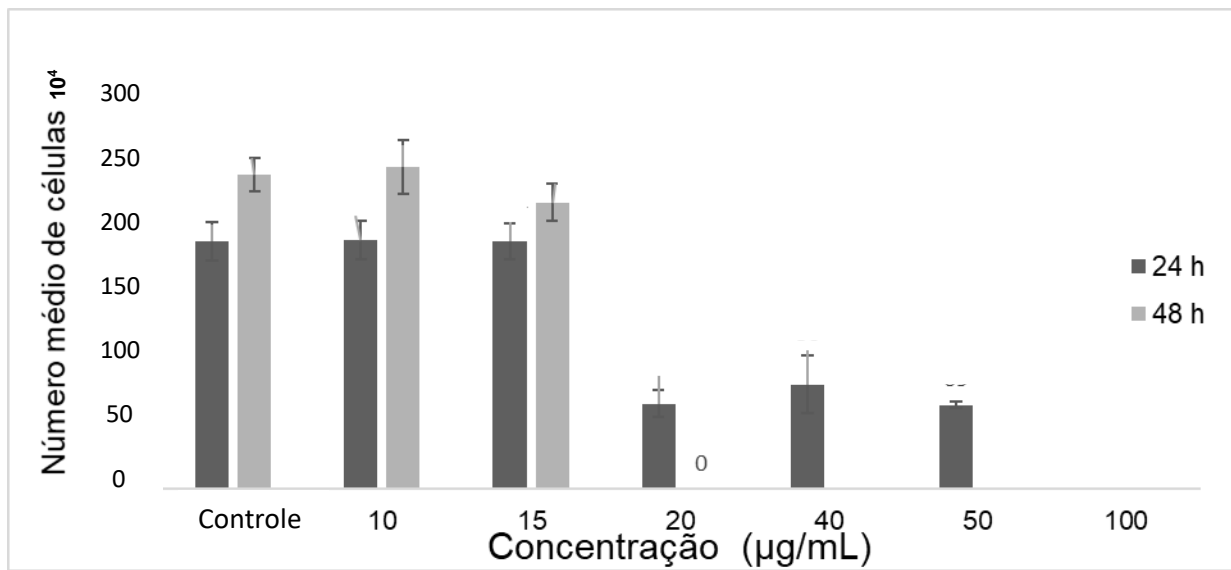


Figura 9 (a) - Efeito da FBMM sobre células LLC-MK2. Número médio de células após incubações com 10, 15, 20, 40, 50 e 100 µg/mL por 24 e 48 h.

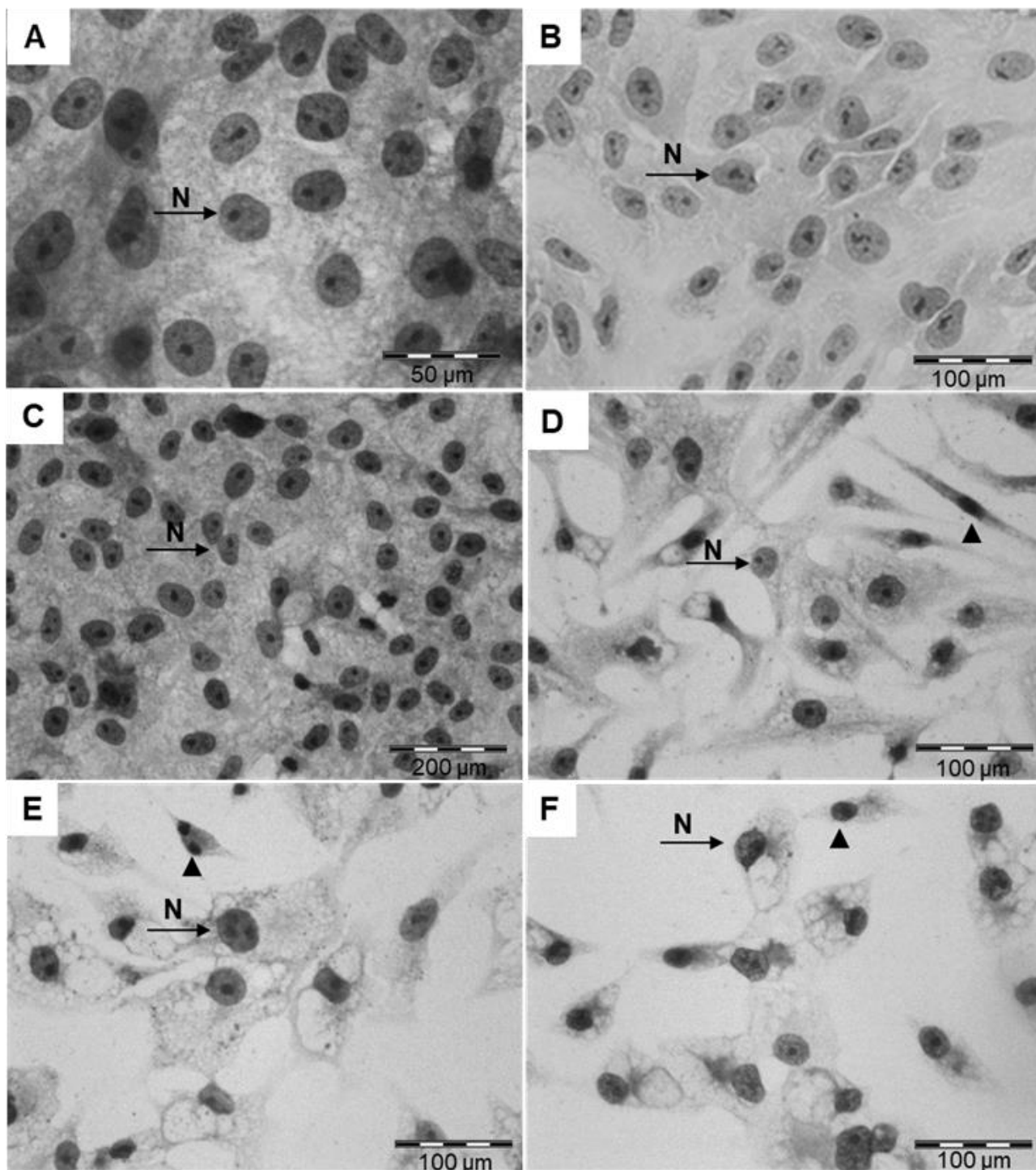


Figura 9 (b)- Microscopia óptica das células hospedeiras LLC-MK2 tratadas com FBMM após 24 h. (A) Células não-tratadas e (B) células tratadas com 10 mg/mL, (C) 15 mg/mL, (D) 20 mg/mL, (E) 40 mg/mL, e (F) 50 mg/mL. Setas mostram o núcleo (N); “cabeças” de setas mostram células condensadas.

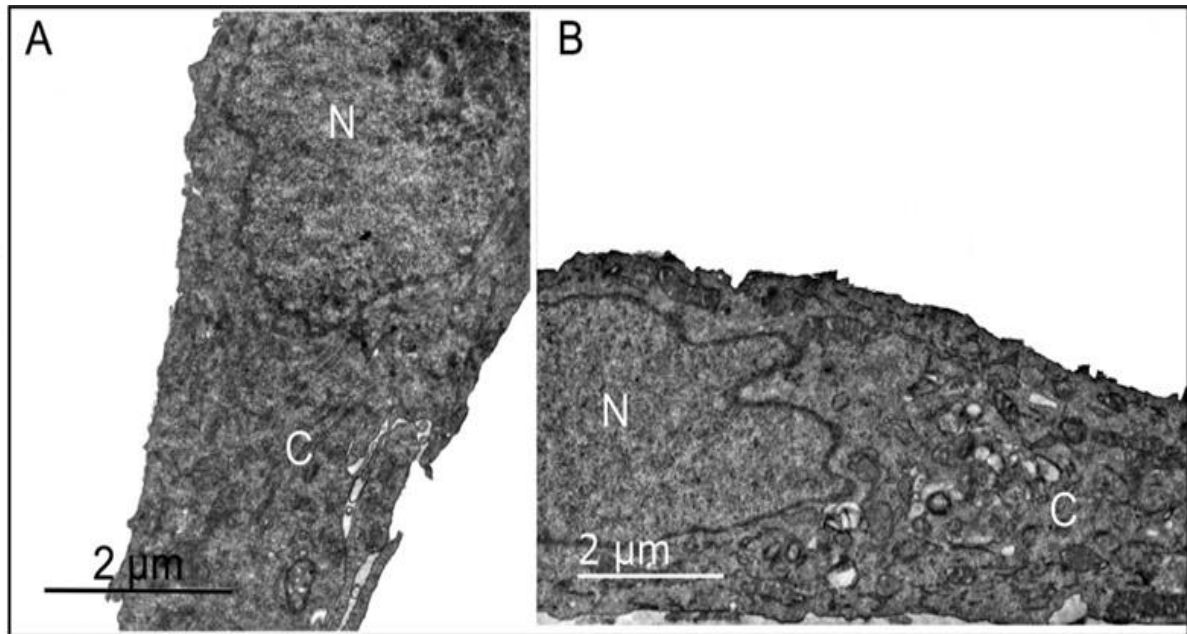


Figura 9 (c)- Microscopia eletrônica de transmissão de células hospedeiras LLC-MK2. (A) Não tratadas e (B) tratadas na presença de 15 µg/mL de FBMM. (N, núcleos; C, citoplasma).

#### 4.4. Análise dos efeitos da FBMM sobre as formas extracelulares tripomastigotas de *T. cruzi*

Usamos as formas extracelulares de *T. cruzi* (tripomastigotas) como modelos para verificar a atividade antiparasitária do FBMM. Os parasitos não tratados proliferaram regularmente após 24 h (figura 10a). A incubação com 0,1-5 µg / mL de FBMM reduziu, mais não significativamente, os tripomastigotas e 50% desses parasitos foram eliminados com 10 µg / mL.

As culturas foram examinadas por microscopia óptica e eletrônica de transmissão para observação da morfologia dos parasitos tratados. Os parasitos não tratados apresentavam morfologia típica, com núcleos, cinetoplastos, flagelos e corpos alongados tanto por microscopia óptica como por microscopia eletrônica (figuras 10b, A e 10c, A). Os parasitos remanescentes após o tratamento com FBMM a 10 µg / mL por 24 h, entretanto, apresentavam corpos condensados e citoplasma vacuolado, sendo que muitos haviam perdido o flagelo (figura 10b, B).

O estudo ultraestrutural mostrou que os tripomastigotas tratados apresentavam organelas de importância metabólica como núcleo, cinetoplasto e mitocôndrias, inchadas, citoplasmas completamente desorganizados e núcleos fragmentados (figura 10c, B e C).

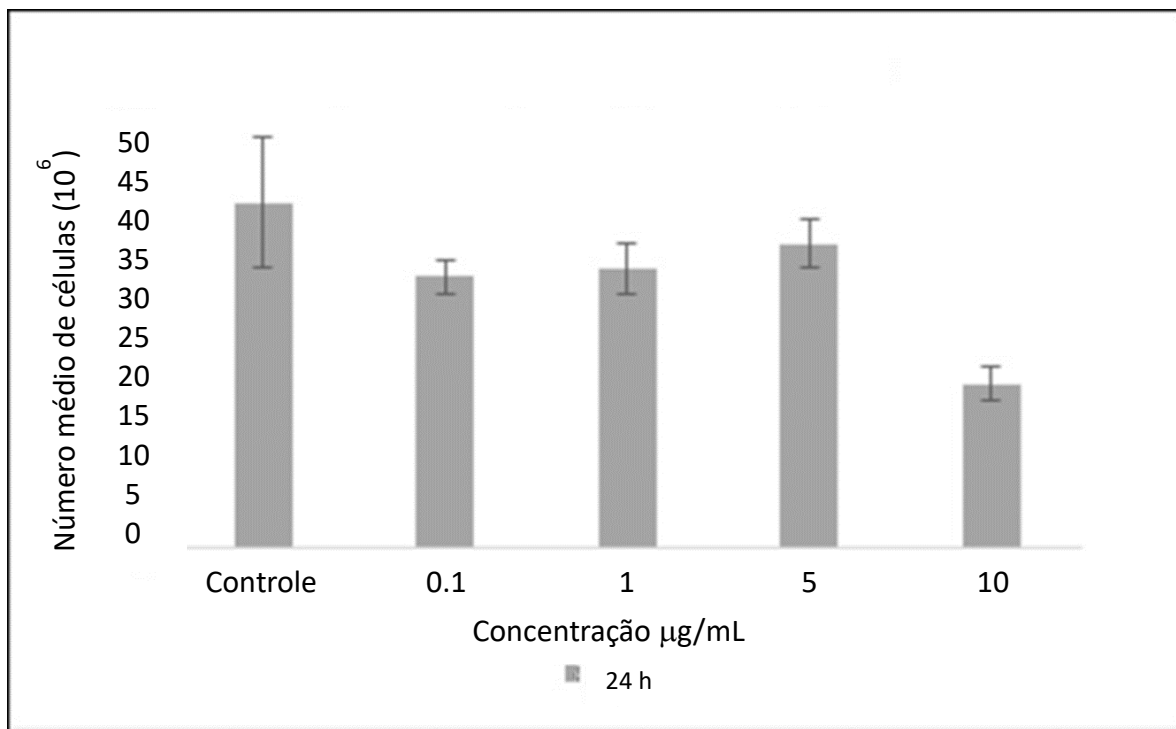


Figura 10 (a)- Efeito da FBMM sobre as formas extracelulares tripomastigotas de *T. cruzi*. Apresentação do número médio de parasitos após incubações a 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL durante 24 horas.

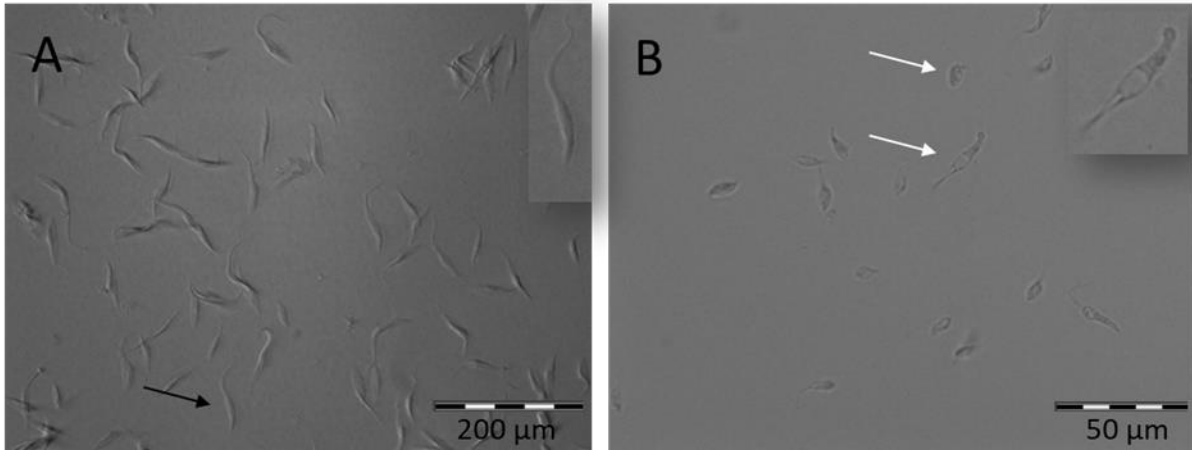


Figura 10 (b)- Microscopia óptica de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. (A) parasitos não tratados e (B) parasitos tratados com 10 µg/mL FBMM durante 24 h. Setas pretas: parasitos viáveis. Setas brancas: parasitos não-viáveis.

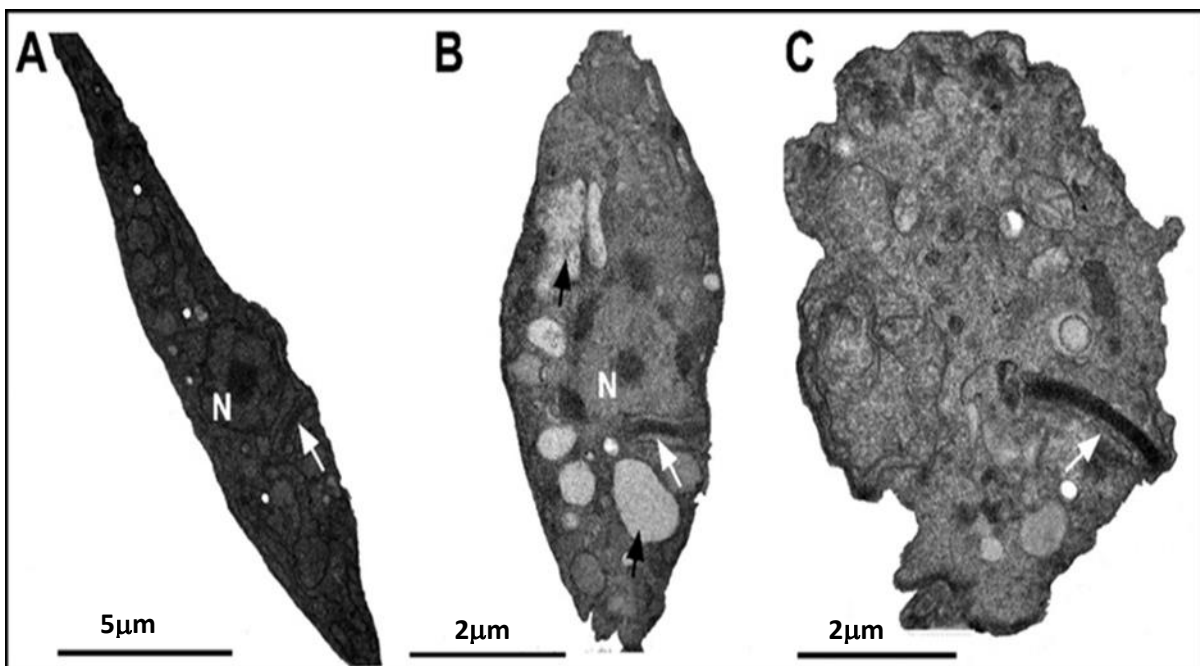


Figura 10 (c)- Microscopia eletrônica de transmissão de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com 10 µg/mL FBMM por 24 h. (A) Parasitos não tratados e (B and C) parasitos tratados com 10 µg/mL FBMM por 24 h. N, núcleo; setas brancas, cinetoplastos; setas pretas, que são organelas de importância metabólica e se apresentam inchadas.



#### 4.5. Efeitos da FBMM sobre as células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii*

Usamos *T. gondii* como modelo parasitário para verificar se o FBMM nas concentrações de 5- 15 µg/mL tinham atividade contra os parasitos intracelulares. A maioria (85%) das células LLC-MK2 não tratadas estavam infectadas (figura 11a). O tratamento com 15 µg/mL, por 24 horas, eliminou 11% dos parasitos. As culturas infectadas incubadas nesta mesma concentração (15 µg/mL) por 48 h, não tiveram suas células hospedeiras afetadas com o tratamento, mas o número de parasitos e a porcentagem de células infectadas foram 49% menores.'

As culturas foram examinadas em microscopia óptica para visualização da morfologia das células tratadas e dos parasitos. As células não tratadas e infectadas apresentaram uma morfologia típica, com citoplasmas não vacuolados e de boa propagação contendo rosetas de *T. gondii*, compatível com o tempo de infecção (figura 11b, A). Menos parasitos intracelulares foram observados, no entanto, para a incubação a 15 µg / mL FBMM por 24 h (figura 11b, B), e muitos dos parasitos restantes tinham uma morfologia completamente alterada, após 48 h de incubação (figura 11b, C – indicados por setas pretas na figura).

As células infectadas foram incubadas com o FBMM a 15 µg / mL por 24 h para avaliação da ultraestrutura dos parasitos eliminados. Os parasitos não tratados estavam se desenvolvendo dentro dos vacúolos parasitóforos e apresentavam características morfológicas típicas (figura 11c, A). Os taquizoítos, após o tratamento, entretanto, estavam completamente desorganizados e continham muitos vacúolos (figura 11c, B – indicado por setas pretas na figura).

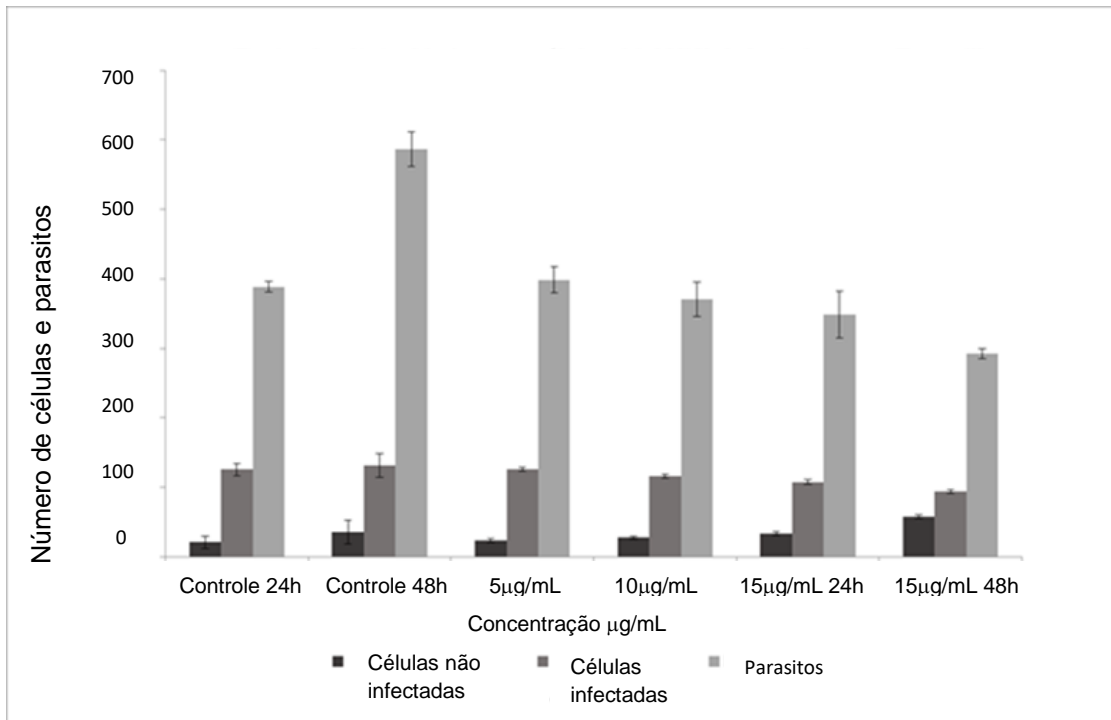


Figura 11 (a)- Efeito da FBMM em células hospedeiras infectadas com *Toxoplasma gondii*. Número médio de células e parasitos após incubações com 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL por 24 horas. Repetimos a incubação com a maior concentração (15 µg / mL) por 48 horas.

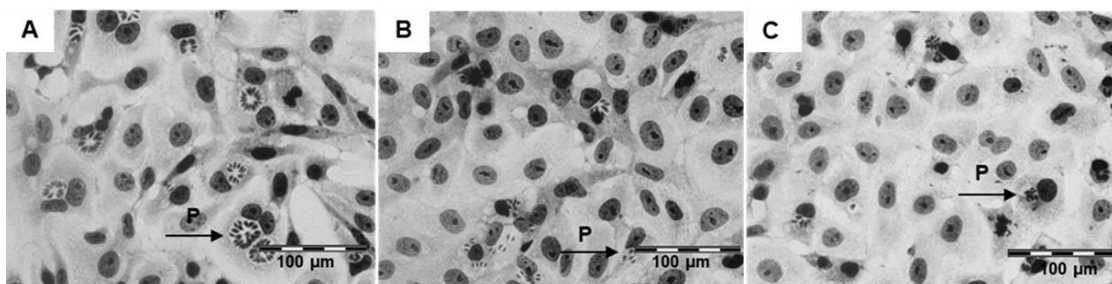


Figura 11 (b)- Microscopia óptica de *Toxoplasma gondii* infectando células hospedeiras LLC-MK2. (A) Cultura infectada não-tratada (B e C) cultura infectada tratada com 15 µg/mL de FBMM após 24 e 48 horas respectivamente. (P= parasitos).

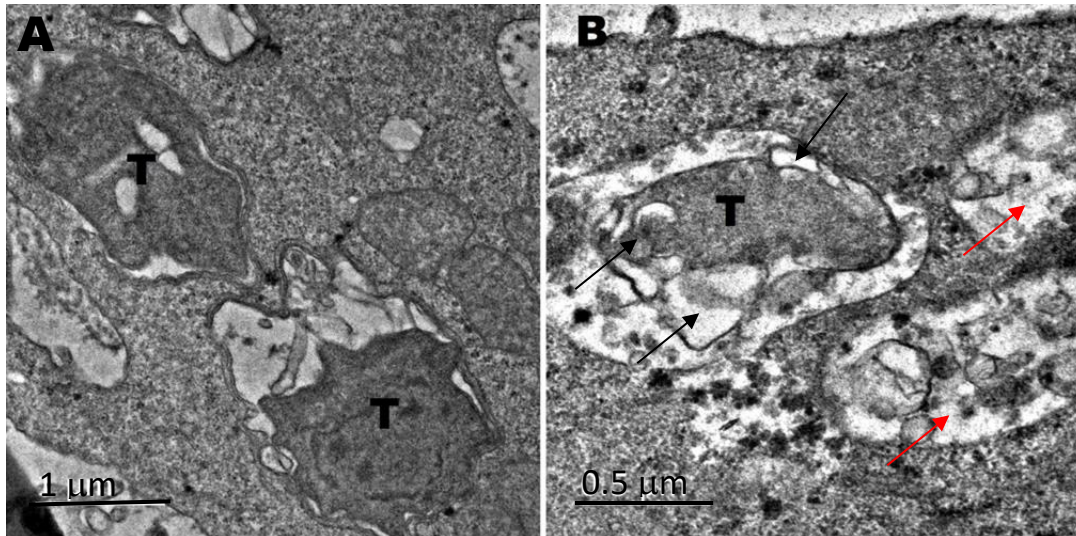


Figura 11 (c)- Microscopia eletrônica de transmissão de células hospedeiras infectadas com *Toxoplasma gondii*. (A) Cultura infectada não-tratada e (B) células tratadas com 15 µg/mL da FBMM. T, taquizoítos de *Toxoplasma gondii*; \*, vacúolos parasitóforos de *T. gondii* completamente degradados – indicados por setas vermelhas.

#### 4.6. Isolamento dos componentes presentes na FBMM

Com o objetivo de investigar qual componente presente no FBMM teria efeito protetor contra infecção por *T. gondii* e contra desenvolvimento do *T. cruzi*, esta fração foi submetida à purificação por cromatografia de fase reversa, em sistema HPLC utilizando coluna C18. A figura 12 mostra o perfil cromatográfico referente ao fracionamento de FBMM, na coluna C18-HPLC. O pico majoritário eluiu com aproximadamente 15% de ACN, em 15 minutos. Este foi coletado e liofilizado para posterior análise por sequência de proteínas e espectrometria de massa.

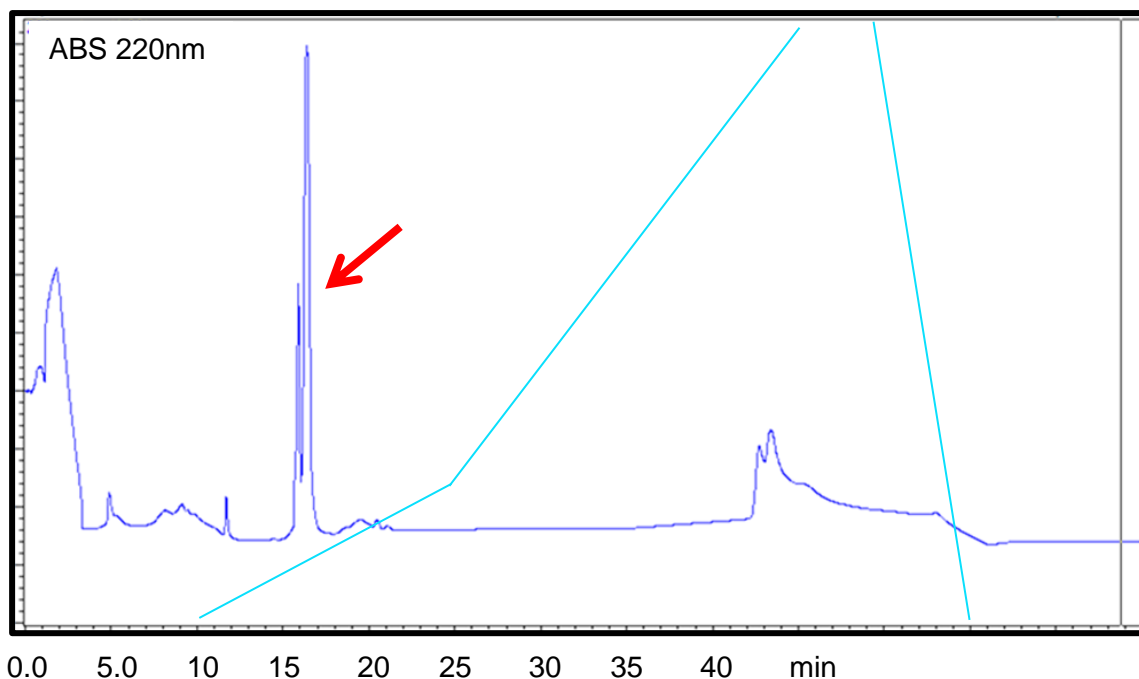


Figura 12 - Perfil de cromatográfico do fracionamento FBMM (seta vermelha) por cromatografia de fase reversa - na coluna C18/HPLC - fase móvel de eluição A: 0,1% TFA e B: 0,1% TFA + 80% ACN).

#### 4.7. Sequenciamento N-terminal

Nenhuma sequência foi obtida quando o peptídeo nativo ou desnaturado, reduzido e alquilado foi submetido ao sequenciamento N-terminal automático, indicando que o N-terminal poderia estar bloqueado ou tratar-se de um peptídeo cíclico.

#### 4.8. Análise de espectrometria de massas

O peptídeo desnaturado, reduzido e alquilado com massa molecular de 2443,76 Dalton foi observado por espectrometria de massa. Este peptídeo também foi observado (figura 13 (a) A, B e C) após clivagem enzimática por Endo-Glu, Endo-Asp e Tripsina. A presença de um pico com massa molécula de 2443,76, similar à MM do peptídeo antes de todas as hidrólises enzimáticas empregada indica uma possível resistência deste peptídeo à clivagem pelas enzimas utilizadas ou talvez a ausência de aminoácidos glutâmico, aspártico ou aminoácido básico nesta sequência. O pico 2443,76, por espectrometria de massa, introduzindo as modificações empregadas durante o processo de desnaturação, redução e alquilação apresentou a seguinte sequência “ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA”. Para fins de certificação de massa molecular, empregamos o programa ExPASy para esta sequência peptídica que apontou valores de ponto isoelétrico= 8.56/ MW= 2229.78Da. Pelos tratamentos empregados: desnaturação, redução e alquilação, os resíduos de cisteínas seriam convertidos em carboximetil cisteína (CMC); portanto, um incremento de 58 Da por resíduo deste aminoácido deve ser computado na massa final do peptídeo. Podemos observar, pela sequência obtida por EM há presença de 4 resíduos de cisteína totalizando 232 Dalton. Como descrito, a sequência N-terminal usando degradação de Edman, não logrou êxito, sugerindo um bloqueio no N-terminal ou a natureza cíclica do peptídeo. A literatura não descreve bloqueios quando Alanina é resíduo N-terminal. No processo de ciclização, uma molécula de água (18 Dalton) seria eliminada. Assim, para cálculo da massa molecular do peptídeo “cíclico” “ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA” identificado pela espectrometria de massas, reduzido e alquilado, teríamos: 2229.78 (massa do peptídeo sem tratamento) + 232 (4 resíduos CMC) – 18 (retirada de uma molécula de água), ou seja, uma massa molecular de 2243, 78 Da, coincidindo com o valor que foi encontrado por espectrometria de massas. Podemos verificar que este peptídeo contém um resíduo de arginina “R” e um resíduo de lisina “K”, normalmente clivados por tripsina. Assim, trata-se de um peptídeo cíclico, resistente à clivagem por tripsina.

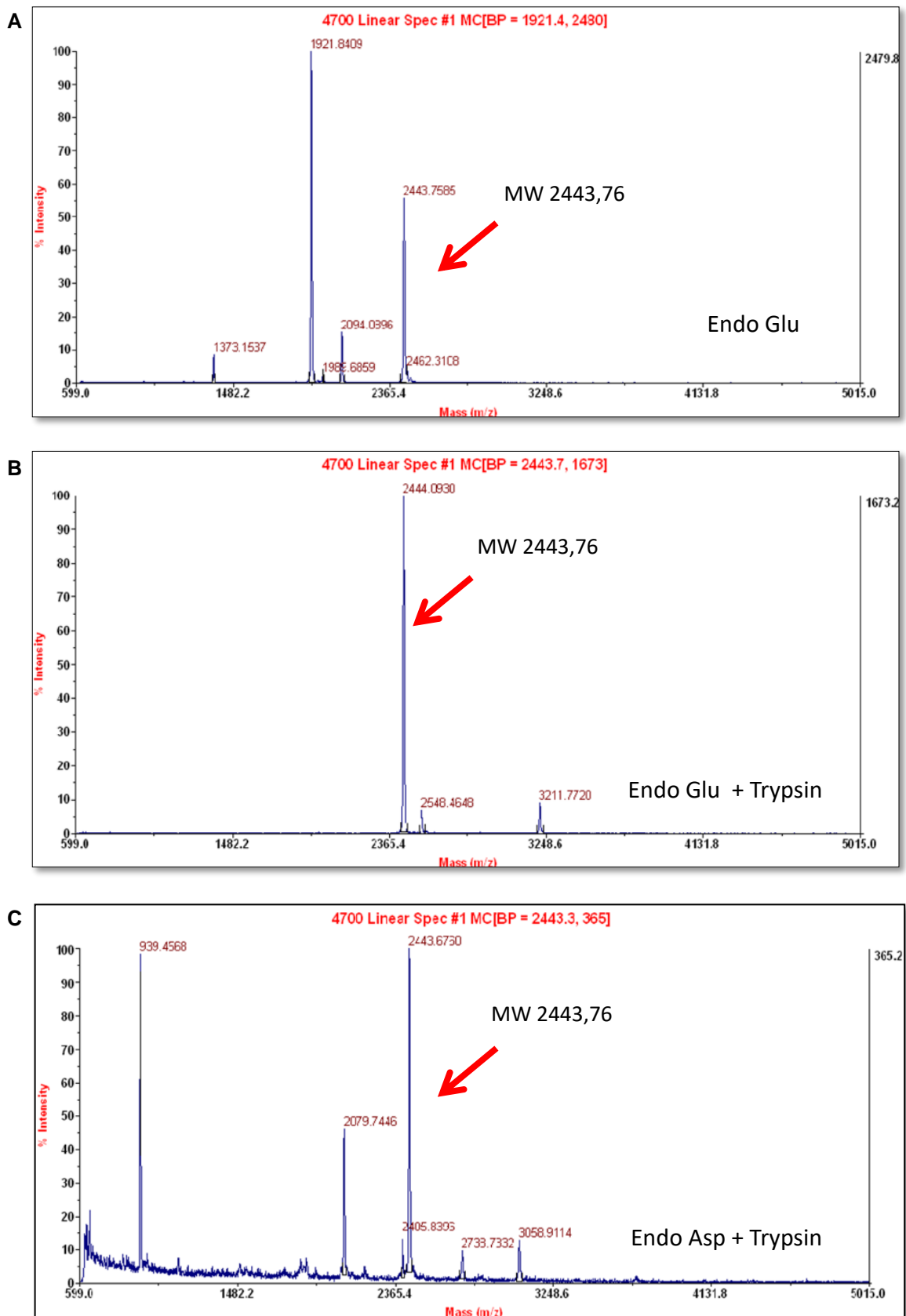


Figura 13 (a)- Perfil de isolamento cromatográfico do peptídeo isolado após alquilação, redução e clivagem enzimática na Coluna C18. A) Clivagem com endo-glutamase; B) clivagem com enzima endo-glutâmica + Tripsina; C) Clivagem com enzima endo-

aspártica + Tripsina. Um pico de massa molecular de 2243, 78 Da ionizou em todos os processos de clivagem realizados. Fase móvel de eluição A: 0,1% TFA e B: 0,1% TFA + 80% ACN.

O peptídeo isolado foi denominado RC-B4. A figura 13 (b, A) mostra a previsão da estrutura secundária utilizando o software JPred, onde podemos observar segmentos de hélice alfa (CCLVM), folhas b (ACVKF) e segmentos desorganizados. A figura 13 (b, B) mostra a previsão da estrutura 3D analisada no portal da web RPBS empregando o software PEP-FOLD3. Foi estabelecida uma estrutura cíclica, com 21 resíduos contendo duas pontes dissulfeto entre os resíduos Cys3-Cys14 e Cys 4-Cys-18, contribuindo para uma resistência à clivagem enzimática.

\

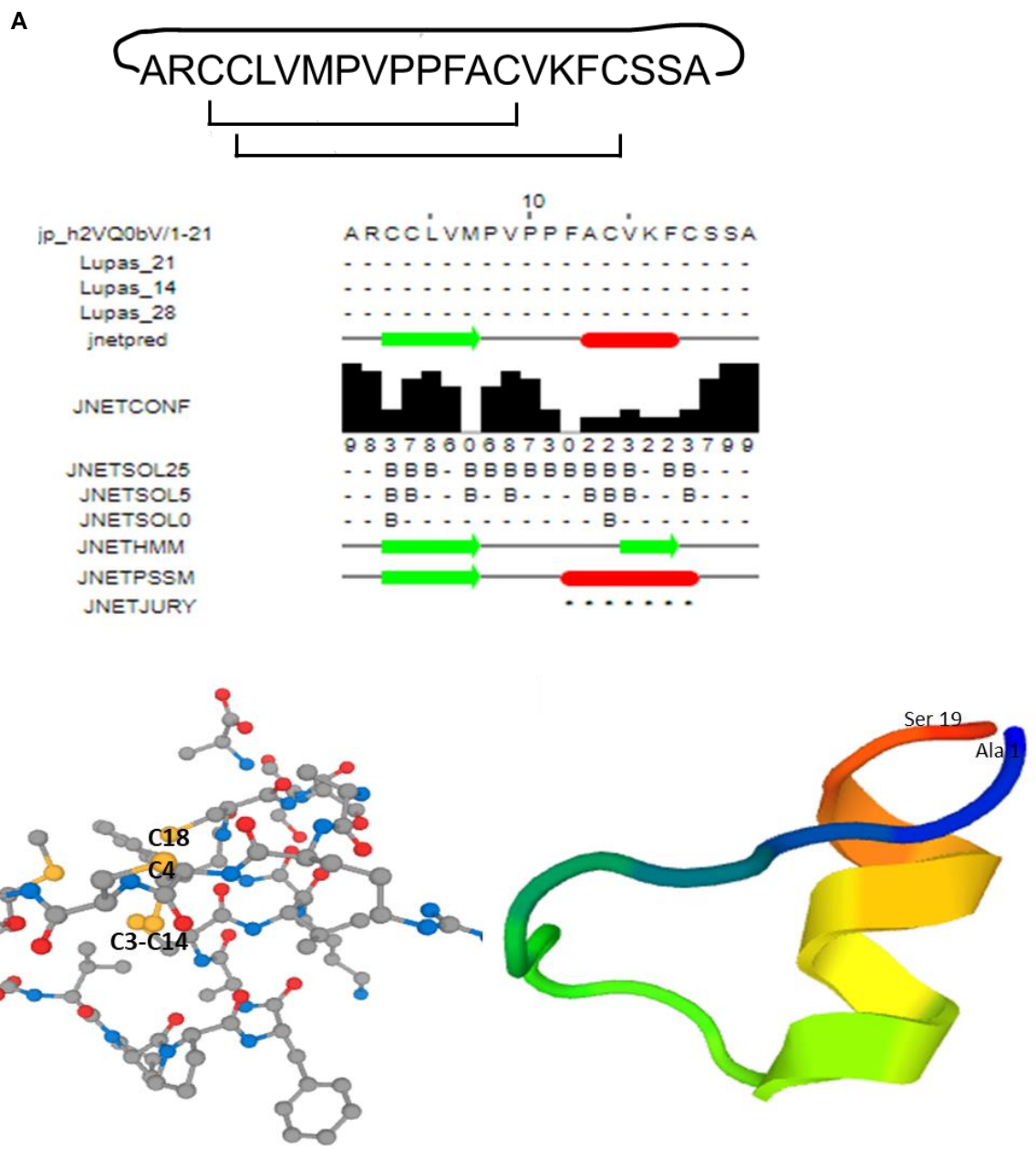


Figura 13 (b) – Sequência do RC-B4 obtida por espectrometria de massas. (A) Predição da estrutura secundária onde as setas verdes indicam segmentos de alfa hélice, os traços vermelhos as folhas b e o tracejado preto os segmentos desorganizados. (B) Predição da estrutura 3D, onde é possível observar a disposição das 4 cisteínas conservadas na estrutura.



#### 4.9. Componente não proteico presente na FBMM

Por espectrometria de massas, além do peptídeo, foi identificado um composto com massa molecular 164.16, similar ao alcalóide ricinina, geralmente presente nas folhas da mamona. Os fragmentos gerados nos estudos por EM confirmaram a presença deste alcaloide.

Para isolarmos este alcaloide, o peptídeo obtido por C18-HPLC foi submetido à cromatografia de filtração em gel, em Sephadex G-10. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 14a.

Com o mesmo propósito, eliminar a ricinina, a FBMM foi repurificada por cromatografia de fase reversa, C18-HPLC. O peptídeo eluiu com aproximadamente 80% de ACN, em 34 minutos. O perfil obtido é apresentado na figura 14b.

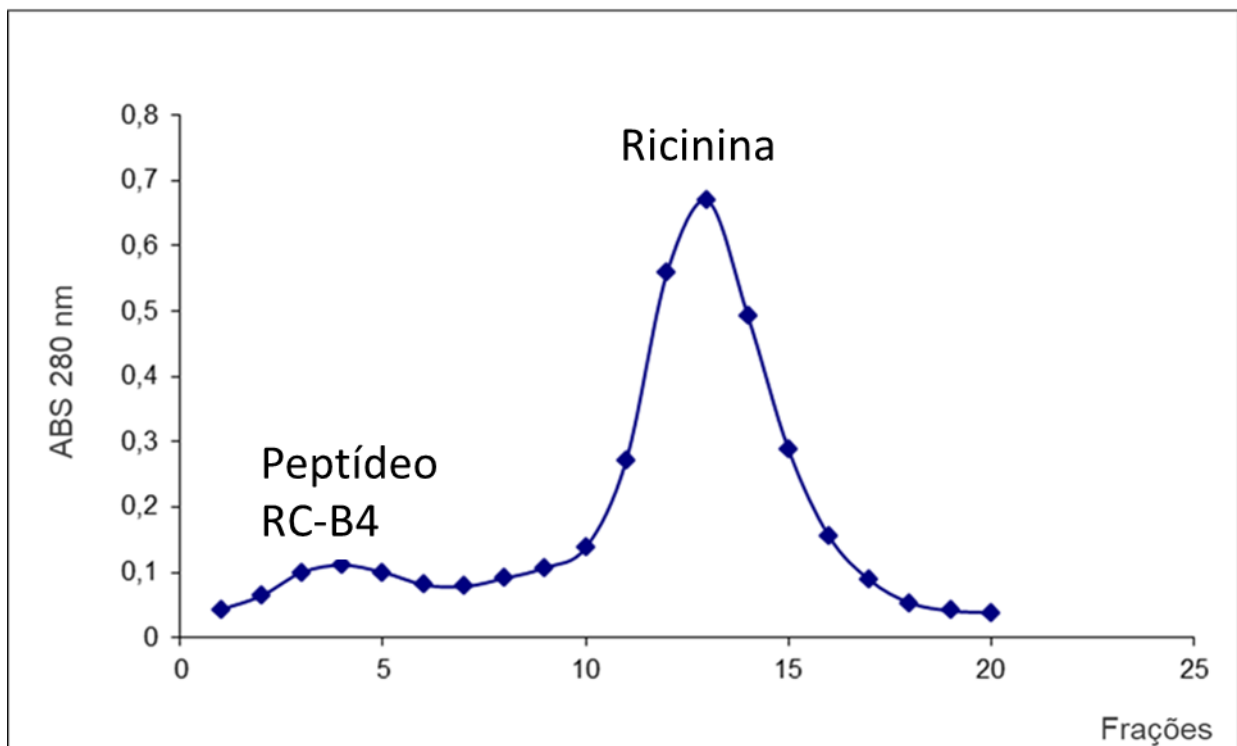


Figura 14 (a)- Perfil cromatográfico da filtração em gel - (Sephadex G-10) - (Coluna 30x1,0 cm) - (eluição de TFA 0,1%) - (Fração de 1,0 mL / tubo (fração de Massa molecular baixo-FBMM)).

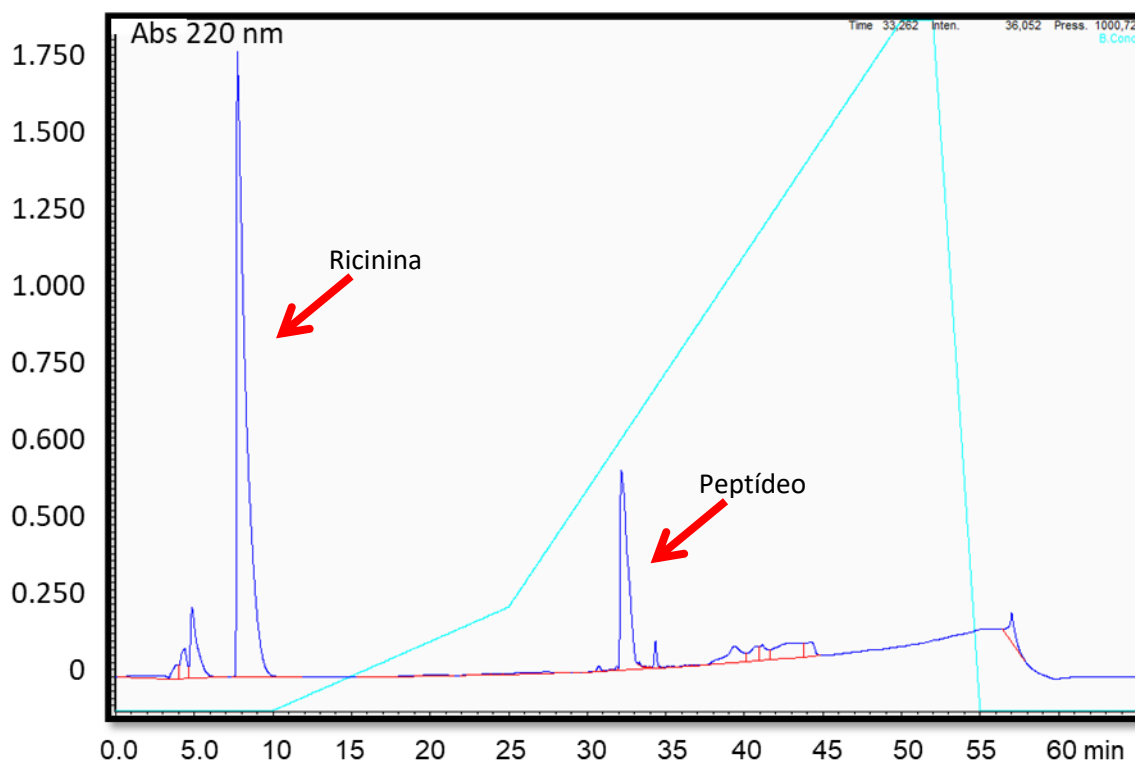


Figura 14 (b)- Perfil cromatográfico de isolamento da ricinina e dos peptídeos da FBMM - coluna C18 - (eluição fase móvel A:TFA 0,1% e B: TFA 0,1% + 80% ACN).

#### 4.10. Ensaio de toxicidade com o peptídeo isolado e com a ricinina

Realizamos o teste de citotoxicidade com os epimastigotas de *T. cruzi* empregando o peptídeo natural e a ricinina na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  para confirmar se a toxicidade observada sob os parasitos vinha dos peptídeos ou da ricinina que estava contaminando a FBMM. Na figura 15, tracejado em amarelo, podemos observar que a ricinina potencializou o crescimento dos parasitos. A mistura contendo peptídeo mais ricinina, tracejado azul, também foi favorável ao crescimento do protozoário. No entanto, a FBMM (linha roxa) e o peptídeo nativo purificado (linha verde) reduziram, de maneira significativa, a proliferação do parasito.

Para certificar estes dados, um peptídeo sintético produzido a partir da sequência determinada por espectrometria de massas foi empregado. Podemos observar (figura 15), tracejado vermelho, que este peptídeo reduziu a taxa de

crescimento do parasito após 24 horas de tratamento e a mesma foi praticamente nula, após 96 horas de incubação.

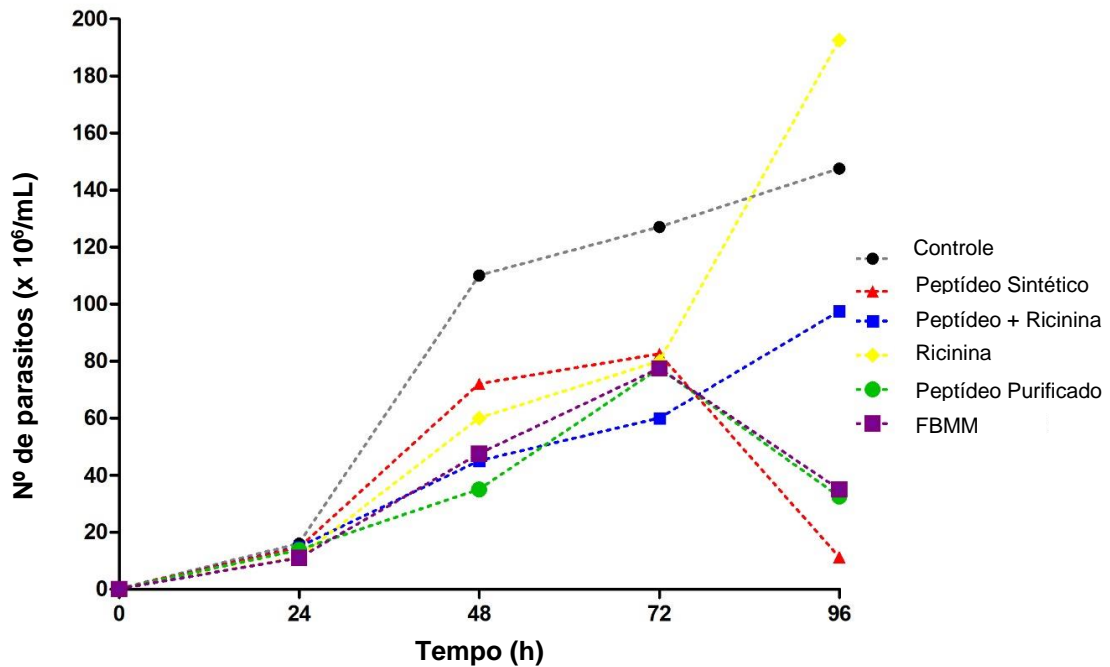


Figura 15 – Efeito do peptídeo sintético (A), ricinina + peptídeo purificado (B); ricinina (C), peptídeo purificado (D) e Fração de baixa Massa Molecular (FBMM (E)) contra a forma epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, utilizando a concentração de 10 µg/mL de cada composto por 96h.

Realizamos os testes (figuras 16 a e 16 b) para obter as informações a respeito do IC50 do peptídeo sintético e peptídeo purificado (natural) e a partir desses dados constatar a eficiência destes peptídeos em retardar o desenvolvimento dos parasitos em 50%. Para o peptídeo sintético, obtivemos o IC50 de 11,8 µg/mL em 48h, 13,21 µg/mL em 72h e 10,52 µg/mL em 96h. Já para o peptídeo purificado, obtivemos o IC50 de 12,12 µg/mL em 48h, 16,2 µg/mL em 72h e 20,87 µg/mL em 96h.

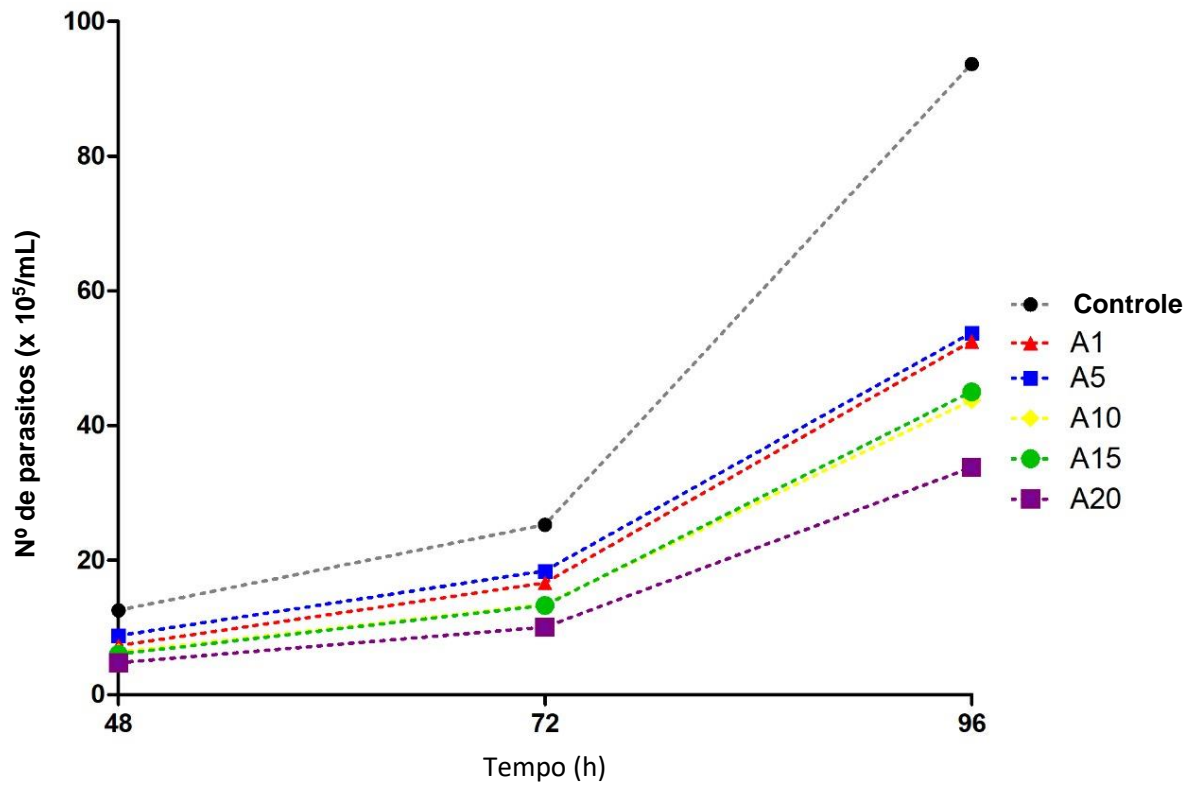


Figura 16 (a) – Peptídeo sintético (A) 50% de concentrações inibitórias (IC50) da forma epimastigota DM28C cultivada de *T. cruzi* (em 1, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

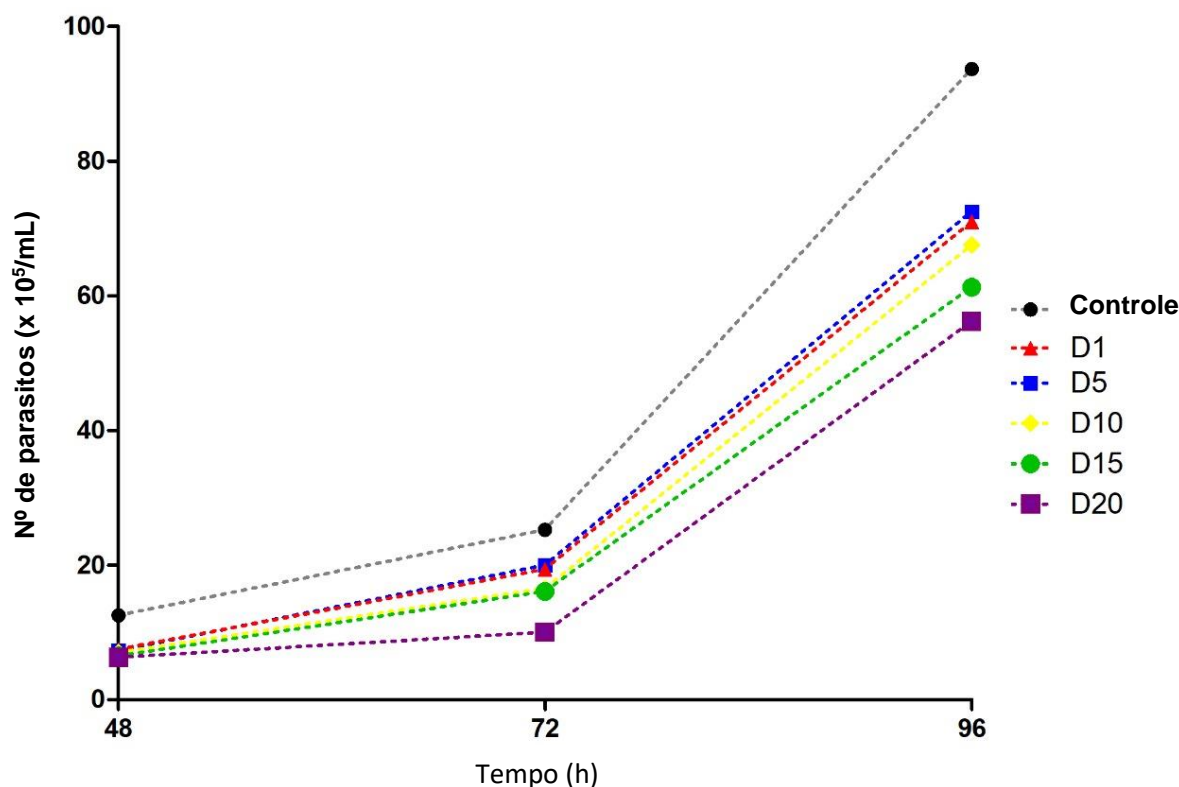


Figura 16 (b) – Peptídeo purificado (D) concentrações inibitórias de 50% (IC50) da forma epimastigota DM28C cultivada de *T. cruzi* (em 1, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 5. Discussão

Drogas antiprotozoárias como nifurtimox, benznidazol, sulfadiazina, pirimetamina e folinato de cálcio são exemplos de fármacos usados para limitar a mortalidade associada à toxoplasmose e doença de Chagas. Os parasitos que causam essas doenças, no entanto, tornaram-se resistentes aos medicamentos usados para combatê-las (Jackson et al. 2010, APT, 2010; Holmes et al. 2011). A identificação de novos compostos com ação antiparasitária é, portanto, necessária. Pereira et al. 2017 revisou a aplicabilidade de produtos à base de plantas no tratamento de infecções por *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei* e listou metabólitos secundários identificados por triagem fitoquímica por cromatografia e/ou espectrometria de massa. A triagem fitoquímica completa e os ensaios de toxicidade foram relatados em apenas 15 (22,73%) e 32 (48,49%) estudos, respectivamente

(Pereira, R., et al. 2017). Descreveremos, agora, o efeito de uma fração polipeptídica em *T. cruzi* e *T. gondii*.

O FBMM, uma fração polipeptídica de sementes de mamona, reduziu a porcentagem de taquizoítos intracelulares de *T. gondii* na concentração de 15 µg/mL, reduzindo a infecção em 11%, em 24 h e em 49%, em 48 h (figura 9b, B e C). Nenhuma toxicidade da célula hospedeira foi observada nesta concentração (figura 7b, C). Um estudo semelhante testou um extrato de *Jatropha curcas* (JcCE) (Soares et al. 2015). Esses autores relataram que culturas de células infectadas por *T. gondii* e incubadas por 24 h com o extrato de JcCE nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,5 e 3,0 mg/mL diminuíram as porcentagens de parasitos para 73,5, 66,6, 56,5 e 18,0%, respectivamente, em relação a um controle. A concentração de FBMM usada contra *T. gondii*, em nosso estudo, foi, significativamente, menor que a de JcCE.

A FBMM induziu toxicidade para uma das formas de *T. cruzi*. A porcentagem de tripomastigotas no meio extracelular em uma concentração de FBMM de 10 µg/mL foi reduzida em 50% em 24 h (figura 8a). A fração proteica alterou a estrutura dos parasitos, levando à morte (figura 8b, B e 8c, B e C). Alexandrino et al. 2016 testaram os efeitos de extratos foliares de *Palicourea marcgravii*, *Palicourea rudgeoides* e *Peperomia tetraphylla* em água, álcool butílico, metanol e diclorometano em epimastigotas de *T. cruzi*. Várias concentrações do extrato aquoso (25-400 µg/mL) contendo todas as substâncias vegetais não inibiram o parasito de forma mais eficiente. Um extrato de álcool butílico foi o melhor inibidor, atingindo 100% de eliminação em 400 µg/mL do extrato de *P. marcgravii* e em 100, 200 e 400 µg/mL do extrato de *P. rudgeoides*. Nosso estudo verificou que o FBMM teve grande efeito sobre os parasitos em concentrações bem inferiores às utilizadas por Alexandrino et al. 2016.

Peptídeos cíclicos, devido a sua rigidez conformacional, possuem várias propriedades benéficas quando comparados a peptídeos lineares. A ciclização reduz a polaridade do composto, o que aumenta a permeabilidade da membrana celular auxiliando na absorção passiva no trato gastrointestinal; confere rigidez ao peptídeo aumentando a afinidade de ligação e a seletividade para a molécula alvo e aumenta a estabilidade da molécula, limitando sua degradação por hidrólise enzimática (Hill, T. A. et al., 2014; White, C. J. & Yudin, A. K., 2011; Adessi, C. & Soto, C., 2002; Shin, M. K. et al. 2018).

Durante nossas análises, o peptídeo purificado, da fração de baixa massa molecular (FBMM > 10 kDa), foi identificado como um peptídeo cíclico apresentando a sequência **ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA**, a qual denominamos de RC-B4, sendo semelhante ao RC-B1 um peptídeo bioativo com atividade antibacteriana, antifúngica, estável isolado de *Ricinus communis L.* Boldbaatar et al., 2015 sintetizaram RC-B1 e determinaram sua estrutura 3D por RMN. A e.

Fizemos testes utilizando os peptídeos (RC-B4) purificado e sintético, onde foi possível observar que o efeito de inibição do desenvolvimento dos parasitos, com ambos os peptídeos, foi muito semelhante.

O fármaco Beznidazol usado para o tratamento da doença de Chagas apresenta um IC50 variando de 2,79  $\mu\text{M}$  a 208,18  $\mu\text{M}$ , quando testado em diferentes cepas da forma epimastigota de *T. cruzi* (Vela, A. et al. 2021). Segundo Moreira, F. F. et al., 2021 o medicamento benznidazol apresenta valor de IC50 na faixa 15,8  $\mu\text{M}$  após 72 h de tratamento para epimastigotas da cepa Maracay. Já o composto peptídico que utilizamos, em sua forma natural, apresentou o IC50 de 12,12  $\mu\text{g/mL}$  a 20,87  $\mu\text{g/mL}$  e em sua forma sintética IC50 de 11,8  $\mu\text{g/mL}$  a 10,52  $\mu\text{g/mL}$ , quando testado sob a cepa DM28C da forma epimastigota de *T. cruzi*. Constatamos, que há uma compatibilidade da concentração utilizada para matar 50% dos parasitos entre a droga já utilizada clinicamente e o composto peptídico alvo de nossos estudos. Sendo promissor continuar nossas investigações sobre este peptídeo e seu mecanismo de ação sobre os modelos parasitários descritos, tanto para ser utilizado como um novo fármaco sozinho como em terapias combinatórias.

Existem estudos utilizando peptídeos em terapias combinatórias que são estratégias, que possuem potencial no combate ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, nas quais são administrados dois ou mais fármacos que possuam ação contra o micro-organismo alvo (Cui et al., 2015; Fonseca, F. H. 2020). Desde quando se iniciou a utilização dos antibióticos é usada a prática de associação de fármacos, que além de diminuir o surgimento de mecanismos de resistência por parte dos micro-organismos, tem a vantagem de permitir a diminuição da dose de administração dos fármacos sem alterar da atividade antimicrobiana e, como consequência, promover a redução dos efeitos toxicológicos dos fármacos (Cui et al., 2015; Brennan-Krohn & Kirby, 2019). Porém, a associação de fármacos pode levar a efeitos adversos, como aumento da toxicidade ou inativação das moléculas por

transformações químicas. Portanto, é necessário o estudo e avaliação preliminares do tipo de interação, seja sinérgica ou antagônica, sendo de extrema importância na aplicação terapêutica de uma combinação de fármacos (Brennan-Krohn & Kirby, 2019).

Poucos estudos são relatados sobre os efeitos de AMPs em protozoários e a maioria deles envolve espécies de *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Toxoplasma* (Lacerda et al., 2016; Torrent et al., 2012; Pretzel et al., 2013).

Mecanismos de ação dos peptídeos antiprotozoários naturais e sintéticos geralmente envolvem a interação com a membrana celular. Peptídeos ativos na membrana podem atuar por perturbação da integridade da membrana, indução de lise celular osmótica, modificação da fluidez das membranas dos protozoários ou prejudicando a atividade das proteínas ligadas à membrana. Ainda é descrito outro mecanismo de ação onde os AMPs são translocados para dentro da célula e interagem com alvos intracelulares, interferindo nas vias metabólicas e bioenergéticas (Torrent et al., 2012; Pretzel et al., 2013).

Existem alguns AMPs que são conhecidos por induzir a morte de protozoários desencadeando processos autofágicos ou apoptóticos em *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*. Porém os AMPs podem interagir com múltiplos alvos, explorando mais de um mecanismo para matar diferentes estágios de desenvolvimento de uma única espécie de protozoário (Pretzel et al., 2013; Adade et al., 2013).

Nossos resultados indicaram que o FBMM e o peptídeo **ARCCLVMPVPPFACVKFCSSA**, purificado desta fração, possuem potencial antiprotozoário. O emprego do peptídeo sintético confirmou estes dados. Acreditamos que o peptídeo esteja agindo em alvos intracelulares do parasito. Concluimos que o mecanismo de ação do peptídeo cíclico totalmente elucidado, juntamente com a possibilidade de seleção ou modificação de peptídeos para as vias biológicas alvo desejadas, pode contribuir para aquisição de novas formas de tratamento das doenças causadas pelos parasitos *T. cruzi* e *T. gondii*.



## 6. Referências

- Aboye TL, Strömstedt AA, Gunasekera S, et al. (2015). A cactus-derived toxin-like cystine knot peptide with selective antimicrobial activity. *ChemBioChem*. 16:1068-1077. doi:10.1002/cbic.201402704.
- Adade CM, Oliveira IRS, Pais JAR, Souto-Padron T. (2013). Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* 69, 227–239.
- Adessi, C., & Soto, C. (2002). Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Current medicinal chemistry*, 9(9), 963-978.
- Albrechtsen, N. J. W; Rehfeld, J. F. (2021). On Premises and Principles for Measurement of Gastrointestinal Peptide Hormones. *Peptides*, p. 170545.
- Alexandrino, C. R.; Carvalho, L. P.; Melo, E. J. T.; Mello, E. O.; Gomes, V. M.; Callado, C. H. and Da Cunha, M. (2016). Bioactivity of leaf extracts from species of *Palicourea* (rubiaceae) on *Trypanosoma cruzi*, *Candida sp.* and *Fusarium solani*. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 489–496.
- Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A. (1990). *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*. 61(7):1277-87
- Amendoeira, M. R. R., & Camillo-Coura, L. F. (2010). Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Sci Med*, 20(1), 113-9.
- Amorim, Débora Silva; Costa, Misael Silva Ferreira. (2021). Tendência da mortalidade por doença de Chagas na Bahia: Entre os anos de 2008 a 2018. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 5, e35210514685.
- Austin, D. J., Kristinsson, K. G., & Anderson, R. M. (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(3), 1152-1156.
- APT, W. (2010). Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 4, p. 243-253.
- Ashby, M., Petkova, A., Gani, J., Mikut, R., Hilpert, K. (2017). Use of peptide libraries for identification and optimization of novel antimicrobial peptides. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 537–553. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160713125555>.
- Barros, M. B. H., de Paula, C. M., Freitas, D. R. C., Das Neves P. A. Y., da Costa, V. V., Valente, S. A., Costa, E. G., & Sobel, J. (2009). Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. *Trop Doct.* 39(4):231–2.

- Benitez, L. B. (2010). Caracterização de peptídeos antimicrobianos de *Bacillus amyloliquefaciens* com atividade antibacteriana, antifúngica e amebicida. Tese para obtenção do título de doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Berman, P., Nizri, S., & Wiesman, Z. (2011). Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. *biomass and bioenergy*, 35(7), 2861-2866.
- Beltrão, N. E. M.; Lima, R. L. S. (2007). Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: Biodiesel. In: Azevedo, D. M. P.; Beltrão, N. E. M. (Ed.). *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª Edição, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, p. 395-416.
- Boldbaatar, D., Gunasekera, S., El-Seedi, H. R., & Göransson, U. (2015). Synthesis, structural characterization, and bioactivity of the stable peptide RC-B1 from *Ricinus communis* L.. *Journal of natural products*, 78(11), 2545-2551.
- Brennan-Krohn, T.; Kirby, J. E. (2019). When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 39, n. 3, p. 345–358.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, 27(1), 347-382.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*, 108:1353–8.
- Brooker S, Clements AC, Bundy DA (2006). Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv Parasitol*.62:221-61.
- Brum, J. W. A., Conceição, A. D. S., Gonçalves, F. D. C., Maximiano, L. H. S., Diniz LBMPV, P. M., & Silva, E. S., (2013). Parasitoses oportunistas em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana. *Rev Bras Clin Med [Internet]*, 11(3), 280-8.
- Burman R, Strömstedt AA, Malmsten M, Göransson U. (2011). Cyclotide–membrane interactions: defining factors of membrane binding, depletion and disruption. *Biochim Biophys Acta*.1808:2665-2673. doi:10.1016/j. bbamem.2011.07.004.
- Caiaffa, W.T.; Chiari, C.A; Figueiredo, A R.; Orefice, S.; Antunes, C.M. (1993). Toxoplasmosis and mental retardation - report of a case control study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 88. 253-61.
- Campos, M. C. O. et al., (2014). Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 193, n. 1, p. 17–19.
- Cantos, G. A., Prando, M. D., Siqueira, M. V., & Teixeira, R. M. (2000). Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46(4), 335-341.

Capecchi, A., Zhang, A., Reymond, J.L., (2020). Populating chemical space with peptides using a genetic algorithm. *J. Chem. Inf. Model.* <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01014>.

Carvalho, M. E. A. (1978). Estudos para obtenção de concentrados de proteínas da mamona desintoxicados e desalergenizadas. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Carvalho, C. M., & Farhat, C. K. (1999). Toxoplasmose adquirida. *Jornal de Pediatria*, 75(1), S63-S67.

Chan-Zapata, I., Arana-Argáez, V. E., Torres-Romero, J. C., & Segura-Campos, M. R. (2019). Anti-inflammatory effects of the protein hydrolysate and peptide fractions isolated from *Salvia hispanica* L. seeds. *Food and Agricultural Immunology*, 30(1), 786-803.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozoniase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1 (2):159-218.

Chagas, C. (1911a). Moléstia de “Carlos Chagas” ou thyroidite parasitária. *Rev Inst Med São Paulo* 14: 337-356.

Chagas, C. (1911b). Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 219-275.

Chagas, C. (1916a). Processos patojenicos da tripanozomiase americana *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 8, pp. 5-36.

Chagas, C. (1916b) Tripanosomiase americana. Forma aguda da moléstia *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 8 (1916), pp. 37-65.

Chagas, C. & Villela, E. (1922). Forma cardíaca da Tripanosomiase americana *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 14, pp. 5-61.

Chagas, C. (1922). The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American tripanosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 15: 1-11.

Chowdhury, S. M., Talukder, S. A., Khan, A. M., Afrin, N., Ali, M. A., Islam, R., ... & Halim, M. A. (2020). Antiviral peptides as promising therapeutics against SARS-CoV-2. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(44), 9785-9792.

Craik, D. J; Malik, U. (2013) Cyclotide biosynthesis. *Current opinion in chemical biology*, v. 17, n. 4, p. 546-554.

Cross, J A. et al. (2021). Fragment-linking peptide design yields a high-affinity ligand for microtubule-based transport. *Cell Chemical Biology*.

Costa, J., & Pacheco, R. S. (2008). Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. *Rio de Janeiro: Imp Novo Milênio*.

Cui, J. et al. (2015). Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, v. 6, n. 4, p. 362–371.

Dias, R. C. F., Lopes-Mori, F. M. R., Mitsuka-Breganó, R., Dias, R. A. F., Tokano, D. V., Reiche, E. M. V., & Navarro, I. T. (2011). Factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women attended in Basic Health Units in the city of Rolândia, Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 53(4), 185-191.

Ferreira, R. T. B., Cabral, M. L., Martins, R. S., Araujo, P. F., Silva, S. A., Britto, C. Branquinho, M. R., Cardarelli-Leite, P., & Moreira, O. C. (2018). Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasites and Vectors*. 11(1):1–11.

Ferreira, V. F., & Pinto, A. C. (2010). A fitoterapia no mundo atual. *Química Nova*, 33(9), 1829-1829.

Fernandes, M. P., Inada, N. M., Chiaratti, M. R., Ara\_ujo, F. F. B., Meirelles, F. V., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Alves, M. J. M., Gadelha, F. R. & Vercesi, A. E. (2010). Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 42:69–78.

Fernández de Ullivarri, M., Arbulu, S., Garcia-Gutierrez, E., & Cotter, P. D. (2020). Antifungal peptides as therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 105.

Figueiró-Filho, E. A., Lopes, A. H. A., Senefonte, F. R. D. A., Souza Júnior, V. D., Botelho, C. A., Figueiredo, M. S., & Duarte, G. (2005). Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 27(8), 442-9.

Filardi, L. S.; Brener, Z. (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 755–759.

Flegr J., Prandota J., Sovickova M., Israili Z. H. (2014). Toxoplasmosis-a global threat. *Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries*. *PLoS One*, 9, Article e90203

Fonseca, F. H. (2020). *Avaliação do efeito sinérgico entre o peptídeo OWHistatina-5 e antifúngicos comerciais na inibição do crescimento de Candida albicans*. Dissertação para obtenção do título de mestre em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista.

Freitas, G. A. (2011). Produção e área colhida de mamona no nordeste. Informe Rural ETENE- Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste Ambiente de Estudos e Pesquisa e Avaliação- AEPA, Nº 14.

Frei F., Juncansem C., Paes J.T. (2008). Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: Viés analítico decorrente do tratamento profilático. *Cad Saúde Pública*. 24(12):2019-25.

Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., & Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol*, 3:72–4.

Garcia E. S., Genta F. A., de Azambuja P., Schaub G. A. (2010). Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*. 26(10):499-505.

Garcia E. S., Azambuja P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 7(9):240-4.

Gonzalez M. S., Nogueira N. F., Mello C. B., De Souza W., Schaub G. A., Azambuja P., Garcia E. S. (1999). Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*. 92(2):100-8.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177(2):751–766.

Göransson U, Burman R, Gunasekera S, Strömstedt AA, Rosengren KJ. (2012). Circular proteins from plants and fungi. *J Biol Chem*. 287:27001-27006. doi:10.1074/jbc.R111.300129.

Gürtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U., & Cohen, J. E. (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134(1), 69-82.

Gustafson KR, Sowder RC, Henderson LE, et al. (1994). Circulins A B. Novel human immunodeficiency virus (HIV)-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. *J Am Chem Soc*. 116:9337-9338. doi:10.1021/ja00099a064.

Gran L. (1973). Effect of a polypeptide isolated from *Kalata-Kalata* (*Oldenlandia affinis* DC) on estrogen dominated uterus. *Acta Pharmacol Toxicol*, 33, pp. 400-408.

Grayer, R. J., & Kokubun, T. (2001). Plant–fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56(3), 253-263.

Hill, T. A., Shepherd, N. E., Diness, F., & Fairlie, D. P. (2014). Constraining cyclic peptides to mimic protein structure motifs. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(48), 13020-13041.

Holmes, M., Crater, A. K., Dhudshia, B., Thadani, A. N., & Ananvoranich, S. (2011). *Toxoplasma gondii*: Inhibitory activity and encystation effect of securinine and pyrrolidine derivatives on *Toxoplasma* growth. *Experimental Parasitology*, 127(2), 370–375.

Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in microbiology*, 2559.

Jackson, Y. *et al* (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 10, p. e69-e75, Nov.

Jennings C., West J., Waine C., Craik D., Anderson M. (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, pp. 10614-10619.

Jennings CV, Rosengren KJ, Daly NL, et al. (2005). Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Möbius strips exist in nature? *Biochemistry*. 44:851-860. doi:10.1021/bi047837h.

Kollien, A. H. and Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today* 16, 381–387.

Koppe, J.G; Loewer, S.D.H.; Roever, B.H. (1986). Results of 20 years follow-up congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1, 254-256.

Lacerda A. F., Pelegrini P. B., De Oliveira D. M., Vasconcelos E. A. R., Grossi-De-S. M. F. (2016). Anti-parasitic peptides from arthropods and their application in drug therapy. *Front. Microbiol.* 7, 91.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 - 680-685.

Lázár, V., Martins, A., Spohn, R., Daruka, L., Grézal, G., Fekete, G., Számel, M., Jangir, P. K., Kintses, B., Csorgo, B., Nyerges, Á., Gyorkei, Á., Kincses, A., Dér, A., Walter, F.R., Deli, M.A., Urbán, E., Hegedus, Z., Olajos, G., Méhi, O., Bálint, B., Nagy, I., Martinek, T.A., Papp, B., Pál, C., (2018). Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nat. Microbiol.* 3, 718–731. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0164-0>.

Lee, S.B. & Lee, T.G. (2017). Toxoplasmic encephalitis in patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Brain tumor research and treatment*, 5, pp. 34-36.

Lelis, R. T. (2012). Efeitos de extratos de plantas da mata atlântica em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Lima, R. L., Severino, L. S., Sampaio, L. R., Sofiatti, V., Gomes, J. A., & Beltrão, N. E. (2011). Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 364-368.

Loffet, A. (2002). Peptides as drugs: is there a market? *J. Pept. Sci.* 8, 1-7.

Lorenzi, H. (2011). *Plantas Tóxicas: Estudo de Fitotaxologia Química de Plantas Brasileiras*. 1 ed. São Paulo. Plantarum, 256p.

Machado, O. L., & Silva Júnior, J. G. (1992). An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* L. seeds which is a part of the 2S albumin precursor predicted by c-DNA data. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas E Biológicas*, 25(6), 567–82.

Martell, Ernesto M. et al. (2021). Host defense peptides as immunomodulators: The other side of the coin. *Peptides*, v. 146, p. 170644.

Medeiros, K. A. D. (2011). Desenvolvimento e testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais.

Melo, E. J., Vilela, K., & Carvalho, C. (2011). Effects of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) and *Melia azedarach* L. (Santa Barbara or cinnamon) on the intracellular development of *Toxoplasma gondii*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(2), 215–222.

Meirelles M. N., de Araujo-Jorge T. C., Miranda C. F., de Souza W., Barbosa H. S. (1986). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 41(2):198-206.

Mitsuka-Breganó, R., et al. (2010). Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas [online]. Londrina: EDUEL. Toxoplasmose. pp. 1-5.

Molesini B, Treggiari D, Dalbeni A, Minuz P, Pandolfini T. (2017). Plant cystine-knot peptides: pharmacological perspectives: plant cystine-knot proteins in pharmacology. *Br J Clin Pharmacol.* 83:63-70. doi:10.1111/bcp.12932.

Montoya J. G., Remington J. S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 47:554-66.

Moreira, F. F., de Araujo Portes, J., Azeredo, N. F. B., Fernandes, C., Horn, A., Santiago, C. P., ... & Seabra, S. H. (2021). Development of new dinuclear Fe (III) coordination compounds with in vitro nanomolar antitrypanosomal activity. *Dalton Transactions*, 50(35), 12242-12264.

Murphy, A. N., Bredesen, D. E., Cortopassi, G., Wang, E. & Fiskum, G. (1996). Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93:9893–9898.

Nascimento, V. V. (2002). Identificação de um polipeptídeo inibidor de  $\alpha$ -amilase isolado das sementes de *Ricinus communis* L.. Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Nascimento, V.V. (2004). Caracterização química e biológica de um peptídeo inibidor de  $\alpha$ -amilase isolado de sementes de *Ricinus communis* L.. Dissertação de mestrado para obtenção de grau de Mestre em Biociências, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

- Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., & Araujo W. N. (2009). Oral transmission of chagas disease by consumption of Açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* Apr, 15(4): 653–655.
- Ng, T. B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*, 25:1215–22.
- Oliveira, P. G. D., Pinto, G. L. F., Grespan, R., Meurer, L., Roesler, R., Schwartzmann, G., ... & Xavier, R. M. (2009). RC-3095, um antagonista específico do receptor do peptídeo liberador da gastrina, como terapia anti-inflamatória na artrite induzida por colágeno (CIA). *Revista HCPA*. Porto Alegre.
- Ovenden, S. P., Fredriksson, S. Å., Bagas, C. K., Bergström, T., Thomson, S. A., Nilsson, C., & Bourne, D. J. (2009). De novo sequencing of RC-B1 to-3: Peptide biomarkers from the castor bean plant *Ricinus communis* L.. *Analytical chemistry*, 81(10), 3986-3996.
- Pereira, R. M., Greco, G. M. Z., Moreira, A. M., Chagas, P. F., Caldas, I. S., Gonçalves, R. V., & Novaes, R. D. (2017). Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: a systematic review of preclinical in vivo evidence. *Parasitology*, 144(10), 1275–1287.
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 237-243.
- Pretzel J, Mohring F, Rahlfs S, Becker K. (2013). Antiparasitic peptides. In: *Yellow Biotechnology I: Insect Biotechnologie in Drug Discovery and Preclinical Research*, Vilcinskis A (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 157–192.
- Rathnayake, A. U. et al. (2021). Characterization and Purification of  $\beta$ - Secretase Inhibitory Peptides Fraction from Sea Cucumber (*Holothuria spinifera*) Enzymatic Hydrolysates. *Process Biochemistry*.
- Rees DC, Lipscomb WN. (1982). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol.* 160:475- 498. doi:10.1016/0022-2836(82)90309-6.
- Remington, D. G. (1990). Toxoplasmosis. In: *Remington, J.S & Klein, J. O Infectious diseases of fetus and newborn infant Philadelphia: W.B.Saunders* 90-195.
- Rondon, F. C., Bevilaqua, C. M., Accioly, M. P., Morais, S. M., Andrade-Junior, H. F., Machado, L. K., ... & Rodrigues, A. C. M. (2011). In vitro effect of Aloe vera, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* L. fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Veterinary parasitology*, 178(3), 235-240.
- Romaña, C. (1935). Dos casos agudos más de enfermedad de Chagas en el Norte Santafesino. *MEPRA*, 21, 14-18.



Rosenthal, Luciane d'Avila; Vieira, Juliana Nunes; Vilela, Marcos Marreiro; Bianchi, Tanise Freitas; Jeske, Sabrina. (2020). Knowledge about Chagas disease and its vectors of individuals from the endemic area of Rio Grande do Sul, Brazil.

Saadi, S et al. (2021). The structural reformation of peptides in enhancing functional and therapeutic properties: Insights into their solid state crystallizations. *Biophysical Chemistry*, p. 106565.

Sabiá Júnior, E.F., Menezes, L.F.S., de Araújo, I.F.S., Schwartz, E.F., (2019). Natural occurrence in venomous arthropods of antimicrobial peptides active against Protozoan parasites. *Toxins* 11, 563. <https://doi.org/10.3390/toxins11100563>.

Saiqali, A. M; Tangutur, A. D; Bhukya, B. (2021). Peptides and low molecular weight polypeptides of *Azadirachta indica* seeds as new weapons against cancer cells and superbugs. *Phytomedicine Plus*, p. 100118.

Santana, R. A. G., Guerra, M. G. V. B., Sousa, D. R., Couceiro, K., Ortiz, J. V., Oliveira, M., Ferreira, L.S., Souza, K.R., Tavares, I. C., Morais, R. F., Silva, G. A. V., Melo, G. C., Vergel, G. M., Albuquerque, B. C., Arcanjo, A. R. L., Monteiro, W. M., Ferreira, J. B. B., Lacerda, M. V. G., Silveira, H., & Guerra, J. A. O. (2019). Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 25(1): 132–135.

Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.

Shafee, T; Harris, K; Anderson, M. (2015). Biosynthesis of cyclotides. *Advances in Botanical Research*, v. 76, p. 227-269.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry*, 68(5), 850-858.

Silva, R. G.G., Vasconcelosa, I. M., Acrísio Filho, J. U. B., Carvalho, A. F., Souza, T. M., Gondim, D. M., Varela, A. L. N. & Oliveira, J. T. (2015). Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. *Industrial Crops and Products*, 70, 48-55.

Shin, M. K., Hyun, Y. J., Lee, J. H., & Lim, H. S. (2018). Comparison of cell permeability of cyclic peptoids and linear peptoids. *ACS Combinatorial Science*, 20(4), 237-242.

Silva, G. R. D., Litvoc, J., Goldbaum, M., & Dias, J. C. P. (1979). Aspectos da epidemiologia da doença de Chagas. *Ciência e Cultura*, 81-103.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.

Souza-Galossi, F. (2018). Efeito de componentes proteicos e do óleo das sementes de *Ricinus communis* L. contra *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Aedes aegypti*. Dissertação para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Stryer, L.; Tymoczko, J. L.; Berg, J. M. (1996). Bioquímica; 4ª Edição. Editora Guanabara.

Suyetin, M et al. (2021). Modelling peptide adsorption energies on gold surfaces with an effective implicit solvent and surface model. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 605, p. 493-499.

Sweeney-Jones, A. M., Gagaring, K., Antonova-Koch, J., Zhou, H., Mojib, N., Soapi, K., ... & Kubanek, J. (2020). Antimalarial peptide and polyketide natural products from the Fijian marine cyanobacterium *Moorea producens*. *Marine drugs*, 18(3), 167.

Thiébaud R, Leproust S, et al. (2007). Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. The SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) *Lancet*, 369:115-22.

Thomas, T. S., & LI Steven, S. L. (1980). Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis* L.. *European journal of biochemistry*, 105(3), 453-459.

Torrent M, Pulido D, Rivas L, Andreu D. (2012). Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr. Drug Targets* 13(9), 1138–1147.

Trovão, F. P., Spaziani, G., Vasconcelos, R. M., Teixeira, R. A., Antunes, R., Patzina, T. P. D. A. B., & Mello, C. F. (2013). Toxoplasmose gástrica em paciente infectado pelo vírus da imunodeficiência humana. Relato de caso. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd*, 11(4).

Valente, S. A. S., Costa, V. V., Neves, P. A. Y., Jesus, B. C. M., Santos, M. P., Miranda, C. O. S., Cuervo, P., Fernandes, O. (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(3):291–7.

Vaz, R. S. (2006). Diagnóstico sorológico, isolamento e caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* em mulheres gestantes atendidas pelo serviço público na cidade de Curitiba. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR.

Vela, A., Coral-Almeida, M., Sereno, D., Costales, J. A., Barnabé, C., & Brenière, S. F. (2021). In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(3), e0009269.

Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., Gadelha, F. R. & Docampo, R. (1991a). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows

the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.*, 266(22):14431–14434.

Vercesi, A. E., Hoffmann, M. E., Bernardes, C. F. & Docampo, R. (1991b). Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. *Cell Calcium*, 12(5):361–369.

Walcher, D. L.; Comparsi, B.; Pedroso, D. (2017). Toxoplasmose gestacional: uma revisão. *Rev. bras. anal. Clin.*, v. 49, n. 4, p. 323-327. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1007913>.

Wang, K., Siddanakoppalu, P. N., Ahmed, I., Pavase, T. R., Lin, H., & Li, Z. (2020). Purification and identification of anti-allergic peptide from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) byproduct enzymatic hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 72, 104084.

White, C. J., & Yudin, A. K. (2011). Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nature chemistry*, 3(7), 509-524.

Woolsey A. M., Burleigh B. A. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol.* 6(9):829-38.

World Health Organization (WHO). (2016). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact sheet N° 340 Updated March 2016. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

World Health Organisation. (2020). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Chagas Dis Fact Sheets [Internet]. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

Xie, M., Liu, D., & Yang, Y. (2020). Anti-cancer peptides: Classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biology*, 10(7), 200004.

Yan, J., Zhao, J., Yang, R., & Zhao, W. (2019). Bioactive peptides with antidiabetic properties: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1909-1919.

Youle, R. J., Huang, A. H. C. (1978). Evidence that Castor Bean allergens are Albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. *Plant Physiol*, 61: 1040-1042.

Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N. & Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resofurin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.*, 253(2):162–168.